

# **Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom-Biophysikerin Beate Habel  
geboren am 10.8.1971 in Gera

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Glaser  
2. Prof. Dr. A. Herrmann  
3. Prof. Dr. U. Zimmermann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. April 2004

## Bibliografische Beschreibung und Referat

Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen

124 Seiten, 100 Abbildungen und 13 Tabellen

Beate Habel, 2004, Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation

### Abstract – Deutsch

Die Basis für den therapeutischen Einsatz elektrischer Felder bei der Behandlung von Knochenbrüchen liegt in der Existenz von belastungsabhängigen elektrischen Potentialen im Knochen. Die zellulären Wirkungsmechanismen sind jedoch unverstanden. Um zu untersuchen, ob und wie elektrische Felder Wachstum und Differenzierung von Knochenzellen beeinflussen, wurden humane Osteosarcomazellen (HOS TE85) und aus Minischweinen isolierte primäre Osteoblasten mit elektrischen Feldern im Frequenzbereich von 0.1 Hz bis 100 kHz befeldet und verschiedene zelluläre Parameter zeitabhängig gemessen.

Das elektrische Feld wurde mittels platinieren Platinielektroden appliziert, um ausreichend hohe Feldstärken bei gleichzeitig guter Kontrolle über die im Gewebe erzeugte Wellenform zu gewährleisten. Beim Einsatz von Elektroden müssen jedoch elektrochemische Reaktionen an der Elektrodenoberfläche berücksichtigt werden. Daher wurden verschiedene Elektroden für die *in vivo*- und *in vitro*-Stimulation mit elektrischen und numerischen Methoden untersucht und verglichen. Das führte einerseits zur Erarbeitung verschiedener Kriterien zur Auswahl geeigneter Elektrodenmaterialien und –geometrien. Andererseits konnten detaillierte Angaben zur effektiven Feldstärke und Feldverlauf in der Zellebene sowie zu elektrochemisch bedingten Nebenwirkungen gemacht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass elektrische Felder das Signalsystem und den Stoffwechsel von Knochenzellen im gesamten untersuchten Frequenzbereich beeinflussen. Die Richtung des Nettoeffekts war jedoch im oberen und im unteren Frequenzbereich unterschiedlich. Im Frequenzbereich über 1 kHz fanden wir immer eine Erhöhung des Wachstums und der Konzentration der „second messenger“ und eine Herabsetzung der Konzentration der reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Bei Frequenzen unter 1 kHz wurde dagegen eine Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase und des oxidativen Stress beobachtet. Signifikante Effekte traten jedoch nur bei Feldstärken oberhalb 100 V/m auf. Hinweise auf bevorzugte Frequenzen oder Wellenformen, die für „Fenstereffekte“ sprechen würden, konnten nicht gefunden werden.

Da alle zellulären Parameter an einem einheitlichen System gemessen wurden, ließen sich die Ergebnisse in ein Modell der feldinduzierten Signaltransduktion integrieren. Prinzipiell muss man von einem gemeinsamen Effekt mehrerer Signalwege ausgehen. Dabei kann die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration als ein genereller Mechanismus der Feldwirkung angesehen werden. Dafür sind sowohl der Influx als auch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verantwortlich. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch cGMP und Prostaglandin E<sub>2</sub>, jedoch nicht cAMP an der Vermittlung der Feldwirkung beteiligt ist. Außerdem wurde die Translokation der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) beeinflusst.

Trotzdem sind die beobachteten Effekte relativ schwach im Vergleich zu publizierten klinischen Erfolgen. Es muss daher *in vivo* Verstärkungsmechanismen geben, die durch Untersuchungen an Zellkulturen nicht erfasst werden können.

### Schlagworte

Elektrische Stimulation, Knochen, Osteoblasten, Kalzium, Proliferation, Signaltransduktion, Elektroden, Alkalische Phosphatase, MAPK

## **Abstract – Englisch**

The therapeutic use of electric fields in the treatment bone fracture healing is based on the existence of different load dependent electric potentials in bone. However, the cellular mechanisms of field action are still not understood. We investigated the effect of electric fields on proliferation and differentiation of human osteosarcoma cells (HOS TE85) and primary osteoblasts isolated from mini pigs. The cells were exposed to electric fields (0.1 Hz - 100 kHz) and various cellular parameters were measured.

The field was applied using platinized platinum electrodes ensuring sufficiently strong electric fields and a well controlled wave form in the tissue. Nevertheless, in this case electrochemical reactions which occur at the electrode surface have to be taken into account. That's why various electrodes for in vivo and in vitro stimulation are characterized by electrical and numerical methods leading not only to criteria for choosing electrode materials and geometries, but also providing detailed knowledge about the electric field induced in the tissue and electrochemically induced side effects.

We found that cellular signaling as well as proliferation and differentiation of bone cells are influenced by electric fields in the whole investigated frequency range. Proliferation and the second messenger concentrations are increased at frequencies above 1 kHz, whereas below 1 kHz the alkaline phosphatase activity is increased. Significant effects were found only for electric fields above 100 V/m, but we could not find any hints on preferred frequencies or wave forms ruling out "window effects".

Because all cellular parameters were measured within one experimental system, the results can be summarized in a signal transduction model for the action of electric fields. Generally, a common action of multiple signaling pathways has to be assumed. The increase of the intracellular calcium concentration can be considered as a general mechanism of field action. This increase is caused by calcium release from intracellular calcium stores as well as influx of extracellular calcium. Additionally, the concentration of cGMP and prostaglandin E<sub>2</sub>, but not that of cAMP is increased by the electric field. Furthermore, the translocation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) is influenced.

Nevertheless, the field effects found are weak compared to those published in clinical studies. We suppose that there are amplifying mechanisms in vivo which could not be seen during in vitro investigations.

## **Keywords**

Electric stimulation, bone, osteoblasts, calcium, proliferation, signal transduction, electrodes, alkaline phosphatase, MAPK

## Zusammenfassung

Ausreichend hohe Feldstärken für die elektrische Stimulation und eine gute Kontrolle über die Wellenform können nur durch die direkte Feldapplikation mit Hilfe von Elektroden erzielt werden, deren Einsatz jedoch mit elektrochemisch bedingten Nebenwirkungen verbunden ist. Diese sind insbesondere während der elektrischen Stimulation von neuronalem Gewebe problematisch. Man muss daher einen Kompromiss zwischen positiven Heilungserfolgen und den unvermeidlichen Nebenwirkungen finden und das für die Stimulation eingesetzte Elektrodensystem charakterisieren.

Kommerziell erhältliche Mikroelektroden für die tiefe Hirnstimulation und in unserem Labor präparierte Platinelektroden für die Stimulation von Zellkulturen wurden mit verschiedenen elektrischen und numerischen Methoden untersucht und verglichen. Das ermöglichte, Ursache und Größenordnung von bekannten, aber unerwünschten Nebeneffekten wie Nekrosen in Elektrodennähe zu klären sowie detaillierte Angaben zur effektiven Feldstärke und Feldverlauf in der Zellebene zu machen. Verschiedene Kriterien zur Auswahl geeigneter Elektrodenmaterialien und Elektrodengeometrien wurden diskutiert. Außerdem konnte erstmalig gezeigt werden, dass insbesondere das Verhalten von Mikroelektroden durch Alterung und Korrosion beeinflusst wird. Diese Tatsache kann das in der Praxis der Langzeitstimulation notwendige Anpassen der Stimulationsparameter erklären.

Die längste Geschichte in der klinischen Anwendung der Elektrostimulation hat die Behandlung von Knochenbrüchen. Die Basis dafür liegt in der Existenz von belastungsabhängigen elektrischen Potentialen im Knochen. Die zellulären Wirkungsmechanismen sind jedoch unverstanden.

Um zu untersuchen, ob und wie elektrische Felder Wachstum und Differenzierung von Knochenzellen beeinflussen, wurden humane Osteosarcomazellen (HOS TE85) und aus Minischweinen isolierte primäre Osteoblasten mit elektrischen Feldern im Frequenzbereich von 0.1 Hz bis 100 kHz befeldet und verschiedene zelluläre Parameter wie die Konzentration von intrazellulärem Kalzium, der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP, der Redoxzustand der Zelle, die Freisetzung von Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ), die Translokation der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie Wachstum und Differenzierung zeitabhängig gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass elektrische Felder das Signalsystem und den Stoffwechsel von Knochenzellen im gesamten untersuchten Frequenzbereich beeinflussen. Die Richtung des Nettoeffekts war jedoch im oberen und im unteren Frequenzbereich unterschiedlich. Im Frequenzbereich über 1 kHz fanden wir immer eine Erhöhung des Wachstums und der Konzentration der „second messenger“ und einen verzögerten Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) bzw. eine Herabsetzung der Nitrit- und  $H_2O_2$ -Konzentration. Bei Frequenzen unter 1 kHz wurde dagegen Hemmung des Wachstums bei gleichzeitiger Erhöhung der ALP-Aktivität und des oxidativen Stress beobachtet. Da alle zellulären Parameter an einem einheitlichen System gemessen wurden, ließen sich die Ergebnisse in ein Schema zur Wirkungsweise elektrischer Felder integrieren.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ein genereller Mechanismus der Feldwirkung ist. Dafür ist sowohl der Influx als auch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verantwortlich. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch cGMP, jedoch nicht cAMP an der Vermittlung der Feldwirkung beteiligt ist. Außerdem wurde die  $PGE_2$ -Freisetzung geringfügig erhöht und die Translokation der MAPK sowohl positiv als auch negativ beeinflusst. Prinzipiell muss man von einem gemeinsamen Effekt mehrerer Signalwege ausgehen.

Die Feldwirkung auf Osteosarcomazellen ist grundsätzlich stärker ausgeprägt als auf primäre Osteoblasten. Vergleichsmessungen an der Fibroblasten-Zelllinie L929 demonstrierten, dass die beobachteten Effekte nicht spezifisch für Knochenzellen sind. Nach elektrischer Stimulation dreidimensionaler Zellverbände, die als Osteocytenmodell dienen können, wurden gegenüber der Monolayerkultur geringere Effekte auf die Proliferation und stärkere Effekte auf die Differenzierung beobachtet. Das lässt darauf schließen, dass durch die Feldwirkung undifferenzierte Zellen bevorzugt zur Teilung stimuliert werden, bei differenzierten Zellen wird jedoch die Matrixbildung gefördert.

Durch den Einsatz verschiedener Synchronisationsmethoden konnten HOS TE85 in einzelnen Zellzyklusphasen gezielt angereichert werden und die Abhängigkeit der Zellreaktion vom Zellstatus untersucht werden. Wir fanden, dass intrazelluläre Kalziumsignale bevorzugt während der frühen S-Phase als Reaktion auf ein äußeres Feld ausgelöst werden. Ein verstärkter Einfluss auf die

---

Proliferation trat jedoch nur auf, wenn Zellen der G<sub>0</sub>-Phase stimuliert und dadurch für den Wiedereintritt in den Zellzyklus rekrutiert wurden. Für einen an Zellpopulationen messbaren und anhaltenden Stimulationseffekt scheinen daher das Zusammenspiel von Zellen verschiedener Phasen und die Verstärkung des Signals durch parakrine Mechanismen notwendig zu sein. Der Effekt könnte überdies durch wiederholte Stimulation verstärkt werden. Für eine optimale Wirkung müsste einmal pro Zellzyklus, d.h. täglich, stimuliert werden. Außerdem erschließt die gegensätzliche Wirkung von Feldern oberhalb bzw. unterhalb 1 kHz in der therapeutischen Anwendung die Möglichkeit, die Richtung, in der das Knochengewebe beeinflusst wird, zu kontrollieren.

Aufgrund der ausgeprägten Gemeinsamkeiten zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen der Wirkung elektrischer Felder und in der Literatur beschriebenen Wirkungen der mechanischen Stimulation könnten diese Ergebnisse die elektrokinetische Hypothese zur Feldwirkung unterstützen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 DAS KNOCHENGeweBE</b>	<b>7</b>
1.1.1 Knochenstruktur und „Bone Remodeling“	7
1.1.2 Existenz und Charakteristik von Potentialdifferenzen im Knochen	7
1.1.3 Mögliche Mechanismen des „Bone Remodeling“	8
1.1.4 Therapeutische Anwendung elektromagnetischer Stimulation	8
1.1.5 Signalwege im Knochen	9
1.1.6 Stand der Forschung zur Elektrostimulation von Knochen	11
<b>1.2 PRAKTISCHE PROBLEME BEI DER ELEKTROSTIMULATION</b>	<b>12</b>
1.2.1 Applikationsart und Wellenform	12
1.2.2 Polarisierung an den Elektroden	14
1.2.3 Elektrochemische Reaktionen an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt	16
1.2.4 Elektrostimulation von neuronalem Gewebe	18
<b>1.3 WIRKUNGSWEISE VON FELDERN IM BIOLOGISCHEN MATERIAL</b>	<b>19</b>
1.3.1 Elektrisches und magnetisches Feld	19
1.3.2 Energetische Überlegungen	19
<b>2 ZIELSTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>22</b>
3.1.1 Zellkultur	22
3.1.1.1 Das Zellmaterial	22
3.1.1.2 3D-Kultur (Eingebettete Zellen)	22
3.1.1.3 Synchronisation der Zellen	23
3.1.1.4 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)	24
3.1.1.5 Untersuchung der Zellgröße	25
3.1.1.6 Untersuchung der interzellulären Kopplung mittels Farbstofftransfer	25
3.1.2 Einzelzell- Fluoreszenzmikroskopie	26
3.1.2.1 ATTOFLUOR	26
3.1.2.2 UV-Dosimetrie	27
3.1.2.3 Untersuchung der Mitogen aktivierten Proteinkinase	28
3.1.3 Fluorometrische und spektrometrische Untersuchungen von Zellpopulationen	28
3.1.3.1 Vorbereitung der Zellen	28
3.1.3.2 Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP)	28
3.1.3.3 Untersuchung des Proliferationsverhaltens	29
3.1.3.4 Extrazelluläre Bestimmung der Nitrit/Nitrat-Konzentration	29
3.1.3.5 Extrazelluläre Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration	29
3.1.3.6 Immunometrische Bestimmung der Konzentration von cAMP, cGMP und PGE <sub>2</sub>	29
<b>3.2 APPLIKATION DER ELEKTRISCHEN FELDER</b>	<b>30</b>
3.2.1 Platinisieren der Elektroden	30
3.2.2 Messkammern und Elektrodensysteme	31
3.2.2.1 Elektroden zur Stimulation von Zellkulturen	31
3.2.2.2 Mikroelektroden für die tiefe Hirnstimulation	31
3.2.3 Untersuchung der Elektrodeneigenschaften	32
3.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	32
3.2.3.2 Strom-Spannungskennlinie	32
3.2.3.3 Impedanzspektroskopie	32
3.2.3.4 Numerische Modellierung des Feldverlaufs	33

3.2.4	Befeldungsprotokoll	33
3.2.4.1	<i>Beobachtung auf Einzelzellniveau</i>	34
3.2.4.2	<i>Untersuchung von Zellpopulationen</i>	34
<b>3.3</b>	<b>VERSUCHSPLANUNG UND AUSWERTUNG</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>TECHNISCHE ERGEBNISSE – EIGENSCHAFTEN DER ELEKTRODEN</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON ELEKTRODEN FÜR DIE STIMULATION VON ZELLKULTUREN</b>	<b>36</b>
4.1.1	Strom-Spannungskurve der Elektroden	36
4.1.2	Analyse des Eingangssignals	37
4.1.3	Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Elektroden	38
4.1.4	Modellierung der räumlichen Feldverteilung	40
<b>4.2</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON MIKROELEKTRODEN FÜR DIE TIEFE HIRNSTIMULATION</b>	<b>41</b>
4.2.1	Strom-Spannungskurve der Mikroelektroden	41
4.2.2	Analyse des Eingangssignals	42
4.2.3	Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Mikroelektroden	42
4.2.4	Modellierung der räumlichen Feldverteilung	43
4.2.5	Alterung und Korrosion von Elektroden	45
<b>5</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE ERGEBNISSE – WIRKUNG ELEKTRISCHER FELDER AUF ZELLULÄRE PARAMETER VON KNOCHENZELLEN</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>DIE INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION</b>	<b>47</b>
5.1.1	Beeinflussung der Messung durch die UV-Empfindlichkeit der Zellen	47
5.1.1.1	<i>UV-Empfindlichkeit von Osteosarcoma- Zellen</i>	47
5.1.1.2	<i>UV-Empfindlichkeit von Osteoblasten</i>	48
5.1.1.3	<i>Abhängigkeit der UV-Empfindlichkeit vom individuellen Zustand der Zellen</i>	49
5.1.2	Wirkung niederfrequenter gepulster elektrischer Felder auf Osteosarcomazellen	50
5.1.3	Wirkung niederfrequent modulierter, elektrischer Hochfrequenzfelder auf Osteosarcomazellen	53
5.1.4	Elektrische Stimulation von synchronisierten Osteosarcomazellen	56
5.1.5	Elektrische Stimulation von Osteoblasten	60
<b>5.2</b>	<b>DER REDOXSTATUS</b>	<b>61</b>
5.2.1	Intrazelluläre Messungen des Redoxstatus an Einzelzellen	61
5.2.1.1	<i>Der Einfluss gepulster elektrischer Felder auf den Redoxstatus von Osteosarcomazellen</i>	61
5.2.1.2	<i>Der Einfluss sinusförmiger elektrischer Felder auf den Redoxstatus von Osteosarcomazellen</i>	62
5.2.2	Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion durch extrazelluläre Messungen an Zellpopulationen	63
5.2.2.1	<i>Stimulation von Zellpopulationen durch niederfrequente Felder</i>	63
5.2.2.2	<i>Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder</i>	64
5.2.3	Bestimmung der NO-Produktion durch extrazelluläre Messungen an Zellpopulationen	64
5.2.3.1	<i>Stimulation von HOS- Zellpopulationen durch niederfrequente Felder</i>	64
5.2.3.2	<i>Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder</i>	66
5.2.4	Zellfreie Versuche	67
<b>5.3</b>	<b>DIE KONZENTRATION DER ZYKLISCHEN NUKLEOTIDE</b>	<b>68</b>
<b>5.4</b>	<b>DIE KONZENTRATION VON PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub></b>	<b>68</b>
<b>5.5</b>	<b>DIE TRANSLOKATION DER MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEINKINASE</b>	<b>69</b>
<b>5.6</b>	<b>DIE BEEINFLUSSUNG DES PROLIFERATIONSVERHALTENS</b>	<b>72</b>
5.6.1	Stimulation von HOS-Zellpopulationen durch niederfrequente Felder	72
5.6.1.1	<i>Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85</i>	72
5.6.1.2	<i>In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85</i>	73
5.6.1.3	<i>In Gel eingebettete HOS TE85</i>	73
5.6.2	Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder	74
5.6.2.1	<i>Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85</i>	74
5.6.2.2	<i>In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85</i>	74
5.6.2.3	<i>In Gel eingebettete HOS TE85</i>	75
5.6.2.4	<i>Primäre Osteoblasten in 2D- und 3D-Kultur</i>	75

5.6.2.5	Stimulation von L929 Fibroblasten	76
5.6.3	Behandlung von HOS TE85 mit konditioniertem Medium	76
<b>5.7</b>	<b>DIE BEEINFLUSSUNG DER ALP-AKTIVITÄT</b>	<b>77</b>
5.7.1	Stimulation von HOS- Zellpopulationen durch niederfrequente Felder	77
5.7.1.1	Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85	77
5.7.1.2	In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85	77
5.7.1.3	In Gel eingebettete HOS TE85	78
5.7.2	Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder	79
5.7.2.1	Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85	79
5.7.2.2	In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85	79
5.7.2.3	In Gel eingebettete HOS TE85	80
5.7.2.4	Primäre Osteoblasten in 2D- und 3D-Kultur	80
5.7.3	Behandlung von HOS TE85 mit konditioniertem Medium	80
<b>5.8</b>	<b>KORRELATION VON FELDWIRKUNG UND FREQUENZ</b>	<b>81</b>
<b>5.9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ZELLBIOLOGISCHEN ERGEBNISSE</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>84</b>
<b>6.1</b>	<b>EIGENSCHAFTEN DER STIMULATIONSELEKTRODEN</b>	<b>84</b>
6.1.1	Die Strom-Spannungs-Kennlinie ist nicht-linear	84
6.1.2	Das Verhalten der Elektroden in der Frequenzdomäne	85
6.1.3	Räumliche Verteilung des Feldes	86
6.1.4	Der Einfluss von Alterung und Korrosion auf das Elektrodenverhalten	88
<b>6.2</b>	<b>DER EINFLUSS ELEKTRISCHER STIMULATION AUF DAS SIGNALSYSTEM VON KNOCHENZELLEN – INTEGRATION DER ERGEBNISSE IN EIN MODELL</b>	<b>89</b>
6.2.1	Elektrisches Feld bewirkt Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration	91
6.2.2	Feldeffekt beteiligt Influx extrazellulären Kalziums und Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern	92
6.2.3	Durch die Fluoreszenzanregung von Fura-2 werden die beladenen Zellen einer relevanten UVA-Strahlungsdosis ausgesetzt	93
6.2.4	Feldeinfluss reduziert UV-bedingten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration	95
6.2.5	ROS-Konzentrationen sind mit Frequenz korreliert	95
6.2.6	ROS-Artefakte durch Elektroden im ELF-Bereich	96
6.2.7	Feldeffekt auf cGMP und PGE <sub>2</sub> , jedoch nicht auf cAMP	97
6.2.8	Transiente Aktivierung der MAPK	98
<b>6.3</b>	<b>DER EINFLUSS ELEKTRISCHER STIMULATION AUF PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG</b>	<b>99</b>
6.3.1	Proliferation und ALP-Aktivität sind mit Stimulationsfrequenz korreliert	99
6.3.2	Konditioniertes Medium wirkt entgegengesetzt zu elektrischem Feld	100
<b>6.4</b>	<b>ABHÄNGIGKEIT DER FELDWIRKUNG VOM ZELLSTADIUM</b>	<b>101</b>
<b>6.5</b>	<b>MÖGLICHE MECHANISMEN DER FELDWIRKUNG</b>	<b>103</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>117</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>121</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>122</b>
	<b>PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE</b>	<b>123</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>124</b>



## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Calciumkonzentration
a.u.	willkürliche Einheiten
ALP	Alkalische Phosphatase
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
c-fos	Ein Proto-Onkogen
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-Monophosphat
c-myc	Ein Transkriptionsfaktor
CPE	Constant Phase Element
EDTA	Ethylendiamintetracetat
ELF	Extremely low frequency
EMF	Elektromagnetisches Feld
ERK	Extracellular regulated kinase
FKS	Fetales Kälberserum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HF	High frequency
HOS	Humane Osteosaromazellen
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
NF-κB	Kernfaktor κB
NO	Nitric oxide
NOS	NO-Synthase
OB	Osteoblasten
p21	Ein Zellzykluskontrollgen
p53	Ein Tumorsuppressorgen
PBS	Phosphatpuffer
PEMF	Pulsed electromagnetic field
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Ras	Ein Proto-Onkogen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	Reactive oxygen species
SACC	Mechanosensitiver Kalziumkanal
SIN-1	3-morpholinosydnonimine
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TV	Tastverhältnis
ULF	Ultra low frequency
UV, UVA	Ultravioletter Bereich, Band A des elektromagnetischen Spektrums
VOCC	Spannungsabhängiger Kalziumkanal

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Knochengewebe

### 1.1.1 Knochenstruktur und „Bone Remodeling“

Knochen ist mesenchymalen Ursprungs, seine Bildung wird durch das Alter und biophysikalische Zusammenhänge bestimmt. Zur Zeit des Wachstums entsteht Knochen durch Mineralisation von Knorpelgewebe, bei Erwachsenen wird er dort gebildet, wo es zu Dehnung und Deformation kommt. Obwohl physikalisch fest, ist Knochen ein lebendes Gewebe (0.6% Zellen, 29.4% organische Matrix, 70% Mineralien), das permanenten Umbauprozessen („Bone Remodeling“) unterworfen ist. Diese Plastizität ermöglicht eine Adaptation an sich ändernde mechanische Belastungen. Dabei werden sowohl die innere Architektur als auch die äußere Form des Knochens verändert [1; 2] und der Knochen auf diese Weise hinsichtlich Masse und Stabilität optimiert.

Diese Umbauprozesse können nur durch das Zusammenspiel der Knochen aufbauenden Osteoblasten und der resorbierenden Osteoklasten stattfinden. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu pathologischem Umbau.

Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs und synthetisieren den organischen Bestandteil des Osteoids. Darunter versteht man ein kollagenes Stützgewebe, das Glykosaminoglycane und spezielle Kalziumbindende Glykoproteine enthält und durch Einlagerung von Mineralsalzen gefestigt wird. Osteoblasten weisen einen hohen Gehalt an rER, Vesikeln und Mitochondrien auf. Durch Matrixabscheidung und Mineralisation mauern sich die Osteoblasten zunehmend ein und werden dann als Osteozyten bezeichnet. Über Zell-Zell-Verbindungen, die in engen Kanälen (Canaliculi) liegen, ist eine Vielzahl von Zellen chemisch und elektrisch gekoppelt, so dass die Sensitivität und Selektivität im Vergleich zu isolierten Zellen erhöht ist [3].

Osteoklasten hingegen entstammen dem hämatopoetischen System und sind an den Stellen aktiver Knochenresorption zu finden. Ihre Ultrastruktur ist gekennzeichnet durch einen ausgeprägten Golgi-Apparat, Lysosomen, Vesikel und einer Vielzahl von Mitochondrien.

Insbesondere Osteoblasten und Osteozyten, teilweise aber auch Osteoklasten sind Zielorgane verschiedener Hormone, zu denen Parathormon, Kalzitinin, Östrogene, Kortikosteroide, Thyroxin und Vitamin-D zählen.

Gelenknah wird der Knochen aus einem schwammartigen Netzwerk von Knochenbälkchen (Spongiosa) gebildet, das eine günstigere Verteilung der Belastung ermöglicht. Die Ausrichtung der Knochenbälkchen entspricht dabei der Lage der Druck- und Zugtrajektorien. Mit zunehmender Entfernung vom Gelenk drängen sich die Knochenbälkchen zusammen und erreichen im Bereich der Röhrenknochen als Kompakta einen hohen Verdichtungsgrad.

### 1.1.2 Existenz und Charakteristik von Potentialdifferenzen im Knochen

Die moderne Anwendung elektromagnetischer Stimulation bei der Knochenheilung begründet sich auf die Tatsache, dass unter mechanischer Belastung *in vitro* und *in vivo* ein elektrisches Feld im Knochen erzeugt wird [4-7]. Daher ging man davon aus, dass diese endogen erzeugten Potentiale eine entscheidende Rolle im Prozess des „Bone Remodeling“ haben.

In Form von Verletzungspotentialen ist das Auftreten von stationären Potentialen schon länger bekannt, aber dieses Phänomen existiert auch an unverletztem, ausgewachsenem Knochen. Dort kommt es zu negativen Ladungsanhäufungen an den Enden eines langen Knochens gegenüber dem mittleren Schaft mit Potentialdifferenzen über 20 mV [8]. Im Fall von Verletzungen und in der Wachstumszone wird der gesamte Schaft negativ aufgeladen mit Extremwerten in der Nähe der Wachstumsplatten und der Bruchstelle. Die entstehende Potentialdifferenz beträgt ca. 2 mV. Verletzungspotentiale erscheinen sehr schnell, kehren aber nach etwa 2 Stunden auf den normalen Wert zurück. Durch diesen Vorgang sollen die Vorläuferzellen der Osteoblasten zur Differenzierung

angeregt werden. Bei verzögerter oder ausbleibender Frakturheilung fehlen diese Potentiale, was einen möglichen Therapieansatz liefert.

Belastungsabhängige Potentiale wachsen mit Größe und Frequenz der Belastung und können Feldstärken von 0.1 – 100 mV/m erzeugen. Zur Erklärung dieses Effekts wurden im Laufe der Zeit verschiedene Hypothesen herangezogen. Überwiegend historische Bedeutung besitzt die Entdeckung der Piezoelektrizität in trockenem Knochen [6; 9]. Dadurch können einige 100 mV Potentialdifferenz entstehen [10]. Diese wird jedoch in physiologischer Umgebung durch Ionenrelaxationsprozesse sehr schnell ( $< 10 \mu\text{s}$ ) abgeschirmt [11-13]. Die plausibelste Erklärung für die Existenz von Potentialen in feuchtem Knochen beruht auf der Entstehung von Strömungspotentialen, hervorgerufen durch die Bewegung einer Flüssigkeit über eine geladene Oberfläche [14]. Die Strömung selbst entsteht durch belastungsbedingte Druckgradienten in den Canaliculi und Haversschen Kanälen. Die daraus resultierende Ladungstrennung verursacht ihrerseits eine elektroosmotische Strömung, die der primären Strömung entgegen gerichtet ist. Die damit verbundene Stromdichte ist jedoch  $10^5$ -mal kleiner. Strömungspotentiale liegen in der Größenordnung von einigen 100  $\mu\text{V}$ . Durch eine Vielzahl von makroskopischen Messungen ergab sich ein Wert von  $1 \mu\text{V}/\mu\epsilon$  ( $\epsilon = \Delta I/I$ ). Das bedeutet bei maximaler physiologischer Belastung (2000-3500  $\mu\epsilon$ ) eine Feldstärke von **1 V/m** über der Knochenrinde mit einer dazugehörigen Stromdichte von 1-10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . *In vivo* ist aufgrund der hohen Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes mit deutlich geringeren Feldstärken zu rechnen [15]. Die lokalen mikroskopischen Strömungspotentiale liegen jedoch aufgrund der mikroskopischen Struktur des Osteoids noch 1-2 Größenordnungen höher [16].

Aktivitäten wie Gehen dehnen bzw. stauchen den Knochen und verursachen endogene Potentiale mit einer Frequenz unter 10 Hz. Weitere Potentiale entstehen durch Kontraktionen des Muskelgewebes, das den Knochen umgibt [17]. Frequenzen, die durch die Haltemuskulatur erzeugt werden, liegen zwischen 20 und 30 Hz.

### 1.1.3 Mögliche Mechanismen des „Bone Remodeling“

Mechanische Belastung des Knochens erzeugt innerhalb der Canaliculi einen Druckgradient, der die extrazelluläre Flüssigkeit durch das Kanalsystem pumpt. Die erzeugte Strömung verursacht wiederum ein Strömungspotential. Gleichzeitig wird die Zellmembran der Osteozyten auch einer Scherkraft ausgesetzt. Die Verformung des Knochens selbst könnte außerdem Dehnungskräfte auf Osteoblasten und Osteozyten übertragen. Es gibt also verschiedene denkbare Erklärungen für den Prozess des „Bone Remodeling“. Aus der Existenz von belastungsabhängigen elektrischen Potentialen im Knochen wurde geschlossen, dass diese Phänomene eine physiologische Bedeutung haben und den Zusammenhang zwischen Form und Funktion des Knochens erklären können. Es wäre jedoch ebenso vorstellbar, dass diese Potentiale nur Begleiterscheinungen anderer, primär biochemischer Prozesse sind. So zeigen experimentelle Arbeiten verschiedener Gruppen, dass elektromagnetische Felder aber auch mechanische Stimulation durch Scherkraft oder Dehnung eine positive Wirkung auf Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten haben [18-20]. Interessant ist, dass Ultraschall, der über mechanische Schwingungen hoher Frequenz ebenfalls Strömungspotentiale im Knochen erzeugt, auch günstig auf die Knochenheilung wirkt [21-24].

Bislang besteht jedoch keine Einigkeit darüber, ob für das „Bone Remodeling“ elektrische Potentiale oder die durch die Strömung selbst hervorgerufenen mechanischen Kräfte primär verantwortlich sind.

### 1.1.4 Therapeutische Anwendung elektromagnetischer Stimulation

Die allgemeine Hypothese, dass mechanisch induzierte elektrische Felder die funktionellen Anforderungen an die Knochenstruktur vermitteln, ist der Ausgangspunkt sowohl für die Forschung als auch für die Therapie durch elektromagnetische Felder [3; 12; 25]. Das begründet sich durch die Tatsache, dass einerseits ein dynamisches elektrisches Muster im Knochen existiert. Andererseits wurden bereits seit einigen Jahren Erfolge der medizinischen Anwendung berichtet. Dazu gehören verschiedenartige Wirkungen künstlich applizierter Felder, die *in vitro* [26-30], *in vivo* [31-34] und klinisch [35-38] festgestellt wurden.

Gleichzeitig gibt es Publikationen über negative Effekte durch den Einsatz elektromagnetischer Felder am Knochen [39-41] und es stellt sich die Frage nach der Spezifität der Wirkung und der verwendeten Wellenform [42; 43]. Da die entsprechenden Wirkungsmechanismen trotz langjähriger Untersuchungen immer noch ungeklärt sind, werden zu diesem Zweck die unterschiedlichsten Felder eingesetzt. Sie variieren in Frequenz, Feldstärke und Wellenform sowie Applikationsart und Anwendungsdauer. Die Optimierung der Parameter gestaltet sich schwierig, da mitunter widersprüchliche Ergebnisse erzielt werden und verschiedene Applikationsanordnungen kaum miteinander zu vergleichen sind.

Es besteht also ein Missverhältnis zwischen der ungeklärten Wirkungsweise und der etablierten klinischen Anwendung elektromagnetischer Felder.

Unter der Annahme, dass elektrische Potentiale am „Bone Remodeling“ beteiligt sind, sollte der therapeutische Einsatz elektromagnetischer Felder das zeitliche und räumliche Muster des Auftretens endogener Felder imitieren. Wie das Schema in Abb. 1-1 zeigt, verknüpft dieser Arbeitsansatz die Signalwege der natürlichen mechanischen und der künstlichen elektrischen Stimulation.

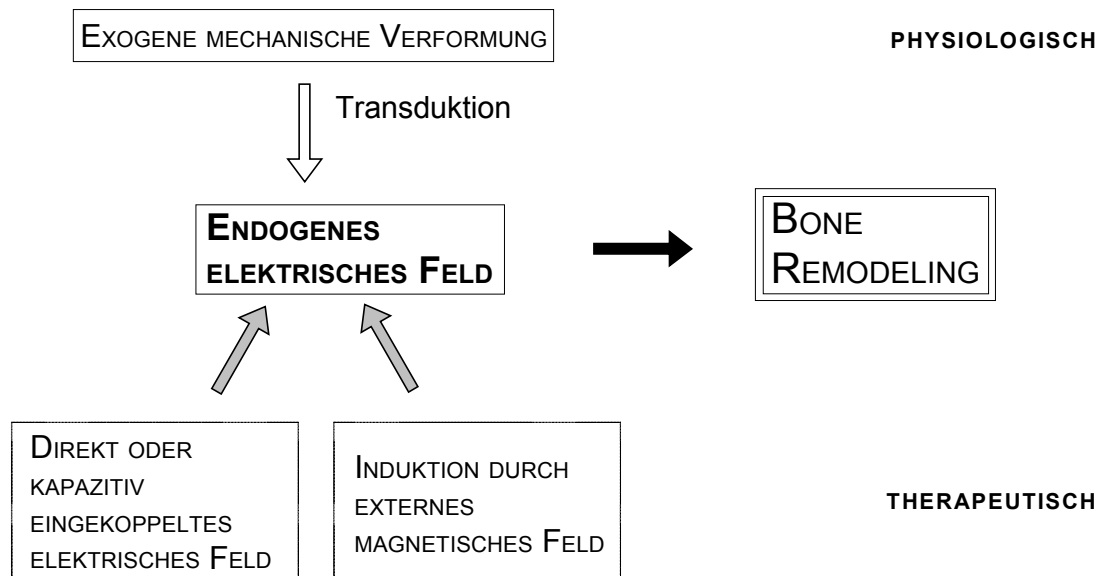


Abb. 1-1 Schema der Wirkungsweise endogener und extern applizierter elektromagnetischer Felder im Knochen.

Ursprünglich wurde versucht, endogene elektrische Felder durch die direkte Applikation von  $\mu\text{A}$ -Strömen über Elektroden oder über die Induktion von Wirbelströmen zu imitieren [44]. Obwohl DC-elektrische Stimulation Mito Transduktion osteogener Zellen stimuliert [45], nimmt man an, dass diese Effekte durch elektrochemische Reaktionen an der Elektrode verursacht sind. Unter Gleichstrombedingungen steigt u.a. der lokale pH an und gelöster Sauerstoff wird verbraucht [46-48]. Hamanishi et al. [49] fanden durch implantierte Elektroden, die ein gepulstes elektrisches Feld übertragen, eine beschleunigte Mineralisation. Die Implantation der Elektroden birgt jedoch ein zusätzliches Risiko von Infektionen.

In jüngerer Zeit wurden zunehmend nichtinvasive Techniken eingesetzt, d.h. das elektrische Feld wurde durch externe Spulen magnetisch induziert oder über externe Kondensatorplatten kapazitiv eingekoppelt. Die Verteilung und Stärke des elektrischen Feldes im Gewebe ist dann aber stark von der Frequenz und den passiven elektrischen Eigenschaften des Gewebes abhängig. Zur Erläuterung dieser Problematik s. Kap. 1.2.1.

### 1.1.5 Signalwege im Knochen

Für den Prozess des „Bone Remodeling“ ist das Zusammenspiel der beiden Knochenzelltypen entscheidend. Da Osteoblasten sowohl neues Knochenmaterial produzieren als auch die Aktivierung der Osteoklasten kontrollieren, könnten sie die eigentlichen Schlüsselzellen im Knochenstoffwechsel sein [50]. Lokale Faktoren wie Wachstumsfaktoren können diesen Prozess auf verschiedene Weise beeinflussen. Solche Signalmoleküle binden normalerweise an spezifische Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche. Anschließend wird das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres umgewandelt.

Verglichen mit der Fülle spezifischer Rezeptoren ist die Zahl der Effektorsysteme beschränkt. Prinzipiell gibt es nur drei Typen von Effektorsystemen zur Signalweiterleitung [51]:

- endogen chemisch durch die Bildung von „second messenger“ (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, cGMP)
- endogen elektrochemisch durch das Öffnen von Ionenkanälen
- exogen chemisch durch autokrin oder parakrin wirkende Substanzen (Prostaglandine, NO, u.a.)

Auf dieser Ebene erfolgt die Uniformierung des Signals und eine erste Modulation der Intensität. Dies geschieht durch die Verknüpfung der Systeme untereinander, abhängig von der Art und Menge der vorliegenden Enzyme und Kofaktoren und deren Kompartimentierung (unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, Proteinkinasen, integrative Prozesse). Veranschaulicht wird das durch die Tatsache, dass die meisten Effektorsysteme zyklische Reaktionsketten beinhalten. Das betrifft z.B. Konformationsänderungen, Assoziations-Dissoziationszyklen von Moleküluntereinheiten oder Phosphorylierungen-Dephosphorylierungen. Außerdem sind alle enzymatischen Reaktionen Gleichgewichtsreaktionen, d.h. Geschwindigkeit und Richtung sind abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner [51].

Auf der letzten Ebene der Signalkaskade wird das Signal erneut aufgespaltet, bestimmt durch die besonderen Eigenschaften der Zielzelle. Dazu zählen u.a. Zellzyklusphase, Reifezustand sowie extrazelluläre Faktoren [52-58]. Daraus folgt, dass das gleiche Signal an unterschiedlichen Zielzellen stark differierende Effekte auslösen kann.

Sehr viele zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung [59], der interne pH-Wert, der Polymerisationsgrad der Strukturproteine [60] sowie die Aktivität vieler Enzyme [61] werden durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert. Daher wurde v.a. den feldinduzierten Kalzium-Effekten eine besondere Bedeutung zugeschrieben [62; 63]. Über die Bindung an Calmodulin kann Kalzium eine spezifische Proteinkinase ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK) und außerdem die membranständige Proteinkinase C (PKC) aktivieren. PKC kann Proteine an Serin- und Threoninresten phosphorylieren und damit deren Funktion modulieren. Dazu zählen z.B. der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter, der Einfluss auf den pH-Wert hat,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, bei deren Aktivierung Membranpermeabilität und -potential verändert werden, die Hemmung der PLC sowie der Einfluss auf Genexpression und Rezeptoraffinität. Der so stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx kann eine weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern triggern [64]. Im Zusammenhang mit dem Zellzyklus ist bekannt, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Generierung von transienten Anstiegen wichtige Triebkräfte für die Progression im Zellzyklus sind [65-70].

Da es in der Zelle mehrere Effektorsysteme gibt, ist prinzipiell auch deren Verknüpfung („cross talk“) möglich. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass PKA die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration negativ reguliert [71] und dass cAMP über einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und dadurch aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle Hyperpolarisation,  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes und -Fluktuationen hervorruft [72; 73].

Seit kurzem betrachtet man auch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) als zelluläre Signale. Dazu zählen z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO,  $\text{OH}^-$  sowie Superoxid und Singulett-Sauerstoff. Diese tragen Radikalcharakter und ihre Bildung kann exogen chemisch oder physikalisch induziert werden; sie entstehen aber auch als Nebenprodukte des Zellstoffwechsels. Eine Übersicht zur Entstehung und möglicher Reaktionswege von Radikalen befindet sich im Anhang. Die intrazelluläre Konzentration von ROS wird durch eine Reihe interner und externer Prozesse beeinflusst und durch Enzyme mit Radikalfängerfunktion gesteuert. Mit der Ausnahme von NO haben Radikale aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer jedoch nur begrenzte Reichweiten in der Zelle. Ihre mögliche Bedeutung liegt in ihrer Fähigkeit, die Signalwege der Zelle wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und PKC zu modulieren [74-76]. Sie können aber auch direkt Transkriptionsfaktoren aktivieren [77]. Obwohl der entsprechende Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, geht man von zwei Wechselwirkungskategorien aus: a) die direkte Wirkung der ROS auf Kinasen oder Transkriptionsfaktoren und b) die Wirkung auf Cystein-reiche, Redox-sensitive Proteine (z.B. Thioredoxin, Glutathion-S-Transferase), die bestimmte Proteine, mit denen sie assoziiert sind, beeinflussen können. ROS, insbesondere NO können aber auch parakrine Wirkung haben und somit benachbarte Zellen beeinflussen [78-84]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass sowohl die endotheliale als auch die induzierbare Isoform der Synthase NOS in Knochenzellen exprimiert und NO

produziert wird. Zum Teil werden jedoch gegensätzliche Effekte berichtet. NO hemmt die Funktion der Osteoclasten [85], diese können aber auch selbst NO produzieren und damit ihre Umgebung beeinflussen. Auf Osteoblasten übt NO jedoch einen biphasischen Effekt aus [86]. Große Mengen von NO, die schnell freigesetzt werden, induzieren bei vielen Zelltypen Apoptose [87]. In kleinen Mengen bzw. bei langsamer Freisetzung wird jedoch die Proliferation stimuliert. Beide Effekte werden durch cGMP- vermittelt.

Ebenfalls parakrin wirken Prostaglandine. Sie besitzen große Bedeutung für die Regulation des Knochenstoffwechsels, da sie in der Lage sind, sowohl die Knochenbildung als auch die -resorption zu stimulieren [88-91]. Andererseits kann PGE2 auch die DNA- und Kollagensynthese dosisabhängig und biphasisch stimulieren [92]. Bei niedrigen Konzentrationen erfolgt eher eine Hemmung, bei höheren Konzentrationen jedoch die Stimulation der DNA-Synthese. Diese wird vermutlich durch Inhibierung bzw. verstärkten Abbau von cAMP vermittelt [93]. Gegenläufig wird die ALP-Aktivität erhöht bzw. herabgesetzt [94].

Die Weiterleitung der Signale an den Zellkern erfolgt u.a. durch die MAPK, die man daher als späte Instanzen der Signalkaskade ansehen kann. Man unterscheidet verschiedene Untertypen: die extrazellulär regulierte Kinase (ERK, i.allg. unter MAPK verstanden), die Stress-aktivierte Kinase (JNK) und p38, eine Kinase, die an der Stressreaktion beteiligt ist [95]. Nach ihrer Aktivierung werden sie in den Zellkern transportiert und können dort verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit regulierend in die Genexpression eingreifen. Das führt letztendlich zu Proliferation, Differenzierung oder Apoptose [96; 97]. Durch die MAPK kann u.a. die zytoplasmatische Phospholipase A2 (PLA2) aktiviert werden, was nachfolgend zur Ausschüttung von Leukotrienen, der Aktinpolymerisation und zur Ausspreitung der Zellen führt. Sie vermitteln aber auch die mechanische Stimulation durch Dehnung oder Scherung [98; 99] und den Zell-Matrix-Kontakt [100]. Dagegen werden MAPK u.a. durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und BMP-2 aktiviert [100; 101], in Maus-Osteoblasten (MC3T3-E1) auch durch extrazelluläres Kalzium [102].

Mit Beginn der Differenzierung wird der Knochenzellstoffwechsel von Proliferation auf die Produktion von Matrix umgeschaltet. Gleichzeitig steigt die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) an. Dieses Ektoenzym sorgt dafür, dass extrazellulär ein alkalisches Milieu entsteht, das für die Mineralisation der neugebildeten Knochenmatrix unerlässlich ist. Damit stellt ALP ein charakteristisches Maß für das Einsetzen der Differenzierung und die Rate der Knochenbildung dar [103; 104]. Farley et al. [61] fanden, dass sich die ALP Aktivität umgekehrt proportional zur extrazellulären Kalziumkonzentration verhält. Auch zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration bzw. dem Kalziumflux und der Proliferation wird in der Literatur relativ oft eine Verbindung gezogen [105-107]. Z.B. sollen nach Cai et al. [108] Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration als Reaktion auf eine veränderte extrazelluläre Konzentration die Ursache für Veränderungen in Zellzyklus und Proliferation sein.

### 1.1.6 Stand der Forschung zur Elektrostimulation von Knochen

Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann u.a. die Proliferation [109], die Proteinsynthese [110], die DNA-Synthese [111], die Verteilung von Membranrezeptoren [112] sowie die intrazelluläre Ionenkonzentration [113] beeinflussen. Von zentraler Bedeutung für das Verständnis und die Optimierung der elektrischen Stimulation sind daher die möglichen Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene. Dazu gibt es viele Publikationen, die sowohl klinische als auch tierexperimentelle Studien sowie *in vitro* Untersuchungen umfassen. Die folgende Zusammenstellung beschränkt sich auf *in vitro* Untersuchungen, um primäre Wirkungsmechanismen aufzuspüren, da diese durch Verstärkungsmechanismen im Gewebe und Effekte am Ende einer Signalkaskade maskiert werden können. Die für die Suche nach primären zellulären Mechanismen bedeutungsvollen Arbeiten lassen sich thematisch in folgende Untergruppen einteilen:

- Änderung der Membraneigenschaften wie Potential, Ionentransport und Rezeptorexposition [112; 114; 115]
- Erhöhung des intrazellulären Gehalts an Kalzium [30; 106; 107; 113; 116-121]
- Veränderung des intrazellulären Gehalts an zyklischen Nukleotiden [112; 122; 123]

- Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Prostaglandinen [109; 110; 112; 113; 116; 124; 125]
- Veränderung der Genexpression [107; 110; 111; 118; 122; 126-131]
- Beeinflussung der Proliferation [109; 115; 126; 132-140]
- Beeinflussung von Differenzierung, Matrixsynthese und Mineralisation [125; 130; 134-136; 139-146]

In theoretischen Betrachtungen wurde ferner betont, dass die Zell-Zell-Kommunikation insbesondere für die Wahrnehmung geringer elektrischer Feldstärken von Bedeutung ist, da sie die Wahrnehmungsschwelle herabsetzen kann [147]. Außerdem kann das Feld selbst die Kopplung beeinflussen [148-152]. Jedoch wurden sowohl negative als auch positive Wirkungen beschrieben.

Es gibt aber bisher keine Übereinstimmung darin, welcher Mechanismus für die Vermittlung der Feldwirkung verantwortlich ist. Möglicherweise ist diese auch Folge mehrerer interagierender Prozesse. Nicht selten wurden in verschiedenen Gruppen widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Außerdem sind verschiedene Applikationsanordnungen kaum miteinander zu vergleichen. Das ist besonders bei der Bewertung klinischer Studien ein Problem.

## 1.2 Praktische Probleme bei der Elektrostimulation

### 1.2.1 Applikationsart und Wellenform

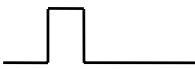


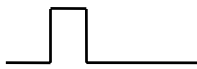
Elektrische Stimulation erfordert den Fluss von Ionenladungen im Medium bzw. im Gewebe; dieser Vorgang kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. Die kapazitive Einkopplung eines elektrischen Feldes in ein System beruht auf der wechselnden Verteilung der Ladungen in der elektrischen Doppelschicht in Abhängigkeit von der Ladung der Elektrodenoberfläche. An der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt findet jedoch keine Elektronenübertragung statt. Die auf diese Weise maximal injizierbare Ladung ist durch die Ladungsmenge, die in der elektrischen Doppelschicht gespeichert ist, d.h. die Doppelschichtkapazität, vorgegeben und beträgt etwa  $10\text{-}20\text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$  [153]. Durch diese kapazitiven Ladungsvorgänge werden zwar keine chemischen Veränderungen im Medium verursacht, es können aber nur geringe Ladungsdichten erzeugt werden. Bei größeren Ladungsdichten kommt es zu etwas ähnlichem wie dem dielektrischen Durchbruch und dem Einsetzen faradayscher Reaktionen.

Metallelektroden müssen die Ladungen im Medium in erster Linie durch faradaysche Prozesse erzeugen, da die für eine physiologische Reaktion erforderliche Ladung bei weitem diejenige überschreitet, die durch Laden und Entladen der Doppelschichtkapazität erreicht werden kann [153].

Alternativ können durch zeitlich veränderliche Magnetfelder im Gewebe elektrische Wirbelströme und demzufolge auch elektrische Felder induziert werden. Deren Verteilung ist von der Konstruktion und Anordnung der Spule sowie der Anatomie und der Leitfähigkeit des exponierten Gewebes abhängig und daher schwer zu verallgemeinern. Zur Abschätzung der induzierten elektrischen Feldstärke muss neben der magnetischen Flussdichte auch die zeitliche Änderung des Magnetfeldes bekannt sein. Allgemein gilt, dass je steiler die Flanke des Pulses, umso höher ist die induzierte Feldstärke. D.h., es ist unmöglich, durch extrakorporal applizierte Magnetpulse rechteckförmige elektrische Feldpulse im Gewebe zu erzeugen. Man erhält lediglich Stromspitzen, die abhängig davon, ob die Pulsflanke ansteigt oder abfällt, entgegengesetzt orientiert sind. Zudem ist es schwierig, die tatsächliche elektrische Feldstärke in der Nähe der Zellen zu bestimmen und zu kontrollieren. Problematisch ist auch die Dauer der induzierten elektrischen Felder. Mechanische Belastung erzeugt transiente Ladungsverschiebungen von ca.  $0.2\text{ -- }20\text{ sec}$  Dauer [7]. Typische Anstiegszeiten der PEMF-Therapie liegen im Bereich weniger  $10\text{ }\mu\text{s}$ . Diese Zeiten sind aber zu kurz, um die Trägheit der Moleküle zu überwinden und eine Ladungsverschiebung zu verursachen [8]. Man muss sich daher zwischen dem Einsatz steiler Pulsflanken, die für kurze Zeit hohe Ströme induzieren, und flacher Pulsflanken, die für längere Zeit geringe Ströme hervorrufen, entscheiden. Es existieren also beträchtliche Unterschiede in

Form, Verteilung und Stärke der Felder, was impliziert, dass endogene elektrische Felder nur ungenügend durch gepulste Magnetfelder (PEMF) nachgebildet werden können [8].

Tab. 1-1 Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden, ein elektrisches Feld im Gewebe zu erzeugen

Art der Feldeinkopplung ins Gewebe	Induktiv	Kapazitiv	Faradaysch
<i>Eingangssignal</i>	<i>Feldverlauf im Gewebe, wenn mit Rechteckpuls stimuliert</i>		
			
<i>Feldstärke im Gewebe</i>	↓	↓↓, frequenzabhängig	ausreichend
<i>Elektrolyse</i>	-	-	+
<i>Invasiv?</i>	-	+/-	+

In der Praxis werden vielfältige Wellenformen verwendet, wobei jedoch überwiegend durch die Applikation von Feldpulsen die räumliche und zeitliche Imitation endogener Felder erreicht werden soll. Wie oben ausgeführt, ist die induktive Kopplung dafür nicht geeignet. Auch die Anwendung kapazitiv eingekoppelter Felder würde die Verzerrung der Pulsform und eine Phasenverschiebung zur Folge haben. Sie ist daher nur für die Stimulation mit harmonischen Wellen anwendbar. Wenn die Stimulation der Zellen durch rechteckförmige elektrische Feldpulse erfolgen soll, kann das Feld nur direkt über Elektroden ins Gewebe eingekoppelt werden. Elektroden bieten den Vorteil, Verlauf und Größe der elektrischen Feldstärke in der Nähe von Zellen oder Gewebe gut beschreiben und kontrollieren zu können. Man muss jedoch einen Kompromiss zwischen der Verwendung ausreichend hoher Feldstärken und den damit verbundenen elektrochemischen Reaktionen finden.

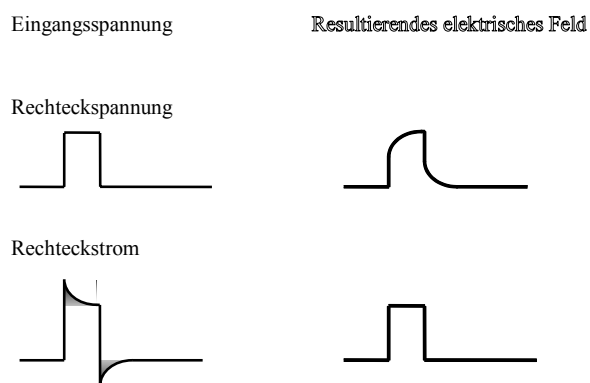


Abb. 1-2 Elektrische Stimulation durch Konstantspannung bzw. durch Konstantstrom bewirken verschiedene Verläufe der elektrischen Feldstärke im Gewebe.

Für die direkte elektrische Stimulation stehen zwei verschiedene Modi zur Verfügung (Abb. 1-2). Bei der Applikation eines Spannungspulses, fällt zeitabhängig ein Teil der Eingangsspannung über der Lösung bzw. der Grenzfläche ab. Dieser Verlust entsteht einerseits durch den ohmschen Widerstand des Elektrolyts, der Wärme erzeugt und andererseits durch Polarisierungseffekte an der Grenzfläche. Das resultierende elektrische Feld wird verformt und ähnelt dem Lade- bzw. Entladestrom eines RC-Kreises. Es ist v.a. schwierig, aus der angelegten Spannung die eigentliche Potentialdifferenz an der

Grenzfläche zu bestimmen und darüber die Abwesenheit irreversibler elektrochemischer Reaktionen sicherzustellen. Um einen rechteckigen Stromverlauf zu erhalten, muss andererseits eine Spannung angelegt werden, die die oben genannten Verluste korrigiert. Man muss davon ausgehen, dass die notwendige „Überschuss-Spannung“, die durch die schraffierten Flächen in Abb. 1-2 gekennzeichnet wurde, zumindest teilweise in chemische Arbeit umgesetzt wird.

Da jeder Nettogleichstrom zu irreversiblen Elektrolytreaktionen führen kann, ist der geringste Schaden für Zellen oder Gewebe zu erwarten, wenn kein Nettogleichstrom fließt und die Ladungsdichte unterhalb der Schwelle für Gasbildung liegt. Das erreicht man am besten mit symmetrischen bzw. ladungsbalancierten Pulsformen. Finden jedoch irreversible Reaktionen statt, insbesondere wenn die



Lösung organische Komponenten enthält, können trotz Ladungsbalance dauerhafte Veränderungen in der Zusammensetzung der Lösung entstehen. Therapeutisch eingesetzte Stimulationselektroden sind meist als Scheiben, Bänder, oder rechteckige Dünnschichten gestaltet, so dass inhomogene Stromdichtenverteilungen hervorrufen werden. Diese können dazu führen, dass die lokalen Ladungsdichten die Schwellen der chemischen Reversibilität überschreiten und lokale Korrosion an Ecken und Rändern begünstigen.

Das für den Einsatz in biologischen Geweben verwendete Elektrodenmaterial sollte inert und biokompatibel sein wie Platin und Iridium [154]. Für die Herstellung von Bioelektroden wird daher sehr häufig Platin eingesetzt, da es sehr korrosionsbeständig ist und außerdem durch niedrige Schwellenpotentiale für die elektrische Stimulation interessant ist. Eine zusätzliche Platinisierung der Oberfläche (Pt/schwarz), d.h. Auftragen einer rauen Edelmetallschicht, kann die Oberfläche mehr als 1000fach vergrößern. Dadurch sinkt die Stromdichte und die elektrochemischen Prozesse verlaufen länger im reversiblen Bereich. Überdies wird die Elektrodenimpedanz um fast 2 Größenordnungen [155] gesenkt und die Lebensdauer der Elektrode erhöht. Dieser Prozess bewirkt ferner, dass die Elektrodenimpedanz im Bereich 1-100 kHz nahezu konstant ist und somit eine gleichmäßigere Stimulation gewährleistet. Trotzdem werden häufig auch Edelstahlelektroden eingesetzt, die jedoch wegen der toxischen Wirkung des durch Korrosion freigesetzten Eisens und anderer in der Legierung enthaltener Metalle jedoch nicht zu empfehlen sind.

### 1.2.2 Polarisierung an den Elektroden

Unter einer Elektrode versteht man ein System, bei dem sich Phasen eines Elektronenleiters und eines Ionenleiters berühren, z.B. wenn ein Metallstab in eine Elektrolytlösung eintaucht. Wird an die Elektrode eine Spannung angelegt, bildet sich an der Phasengrenze eine elektrische Doppelschicht heraus. Der Durchtritt von Metallionen oder Elektronen durch die Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt führt zu einem thermodynamisch definierten Gleichgewichts-Elektrodenpotential, welches durch gleiche Austauschstromdichten in beide Richtungen charakterisiert ist. Fließt durch eine solche Elektrode ein zusätzlicher Strom, wird das Elektrodenpotential durch auftretende Polarisationserscheinungen verändert. Diese stromdichteabhängige Abweichung von der Gleichgewichtsspannung nennt man Polarisierung oder Überspannung [156].

Die Überspannung hat zwei prinzipielle Ursachen: zum einen verändert der Stromfluss an der Elektrodenoberfläche die Konzentration der das Elektrodenpotential bestimmenden Reaktionspartner, zum anderen ist eine zusätzliche Spannung notwendig, damit die potentialbestimmenden Ladungsträger überhaupt durch die Phasengrenze treten können. Daher unterscheidet man in Konzentrations- und Durchtrittspolarisation. Die Durchtrittsüberspannung bezeichnet den Spannungsabfall an dem Widerstand, den die Phasengrenze Festkörper/Elektrolyt dem Durchtritt von Ladungsträgern entgegensetzt. Die Konzentrationsüberspannung wird durch in Stromrichtung ortsabhängig auftretende Konzentrationsänderungen der Ladungsträger oder der Reaktionspartner verursacht. Da es für die Entstehung eines Konzentrationsgradienten verschiedene Ursachen geben kann, unterteilt man in 1) Diffusionsüberspannung, die auf einer Verarmung oder Anreicherung der an der Gesamtreaktion teilnehmenden Partner beruht, 2) Reaktionsüberspannung, welche aus der Hemmung einer vorangehenden oder Folgereaktion resultiert (einschließlich Hydrations- und Dehydrationsvorgänge) und 3) Kristallisationsüberspannung, die auftritt, wenn Ein- oder Ausbau der Metallionen in bzw. aus dem Kristallgitter gehemmt sind. Außerdem unterscheidet man noch eine Widerstandsüberspannung, die dem ohmschen Spannungsabfall an der Elektrode entspricht, der z.B. durch eine Beschichtung entstehen kann. Meist liegen mehrere dieser Effekte gleichzeitig vor, so dass sich die Gesamtpolarisation aus der Summe der verschiedenen Anteile ergibt. Dabei entsprechen Widerstands- und Durchtrittspolarisation irreversiblen Vorgängen, die Unterarten der Konzentrationspolarisation sind hingegen reversibel.

Eine Grenzfläche, an der eine elektrochemische Reaktion stattfindet, kann man mit einem elektronischen Schaltkreis vergleichen, welcher aus einer bestimmten Kombination von Widerständen und Kapazitäten besteht. Dann kann das elektrochemische System durch die Komponenten seines Äquivalentschaltkreises beschrieben werden. Ein Widerstand würde eine Leitfähigkeit repräsentieren, wie die Leitfähigkeit des Elektrolyten oder den elektronenübertragenden Schritt einer Redoxreaktion.

Kapazitäten würden u.a. die Polarisierung von Ladungen und Adsorptionsvorgänge beschreiben [157]. Dementsprechend lassen sich die Vorgänge in der Grenzfläche in dem Ersatzschaltbild, wie es Abb. 1-3 zeigt, darstellen.

Die Ladungsverteilung in der Doppelschicht hängt vom Elektrodenmaterial, der Zusammensetzung des Elektrolyten und der den Gleichgewichtszustand der Elektrode bestimmenden Redoxreaktion ab. Bei Adsorption von Ionen oder polarisierten Makromolekülen an der Elektrodenoberfläche, muss die Doppelschicht als eine Reihenschaltung von mehreren Kapazitäten beschrieben werden [158]. Die Reaktionsimpedanz führt bei einem zeitabhängigen Signal zu einer Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung, die sowohl vom Signal als auch von der Reaktionsgeschwindigkeit abhängt; die Diffusionsimpedanz verursacht jedoch immer eine Phasenverschiebung von  $45^\circ$  (Warburg-Impedanz). Während Doppelschichtkapazität und Durchtrittswiderstand nicht von der Frequenz abhängen, sind Diffusions- und Reaktionsimpedanz frequenzabhängig. Außerdem werden sie von der Reaktionsstromdichte, aber auch durch die Diffusionskonstanten der Reaktanden bestimmt.

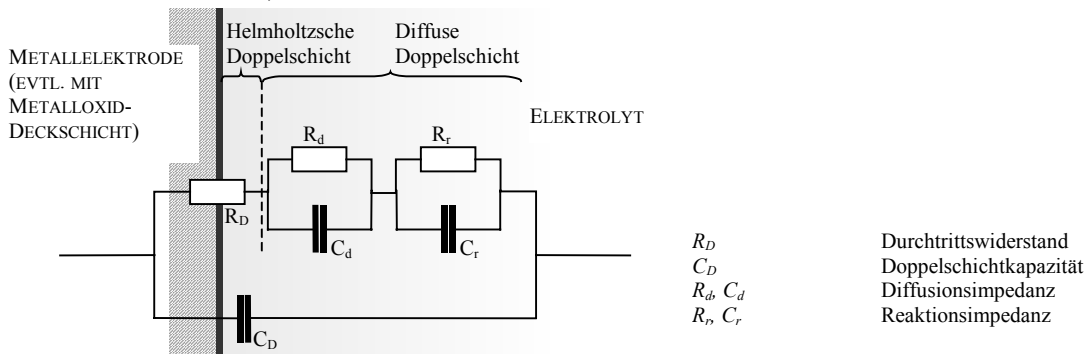


Abb. 1-3 Ersatzschaltbild der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt

Finden mehrere diffusionsabhängige Schritte und/oder mehrere Redoxreaktionen statt, müssen diese im Ersatzschaltbild Abb. 1-3 durch eine entsprechende Anzahl von RC-Gliedern berücksichtigt werden. Die Elektrode stellt sich dann als ein komplexes Netzwerk aus RC-Gliedern dar, dessen Impedanz sich während der Stimulation verändert. Dieses Netzwerk kann durch die Verwendung eines modifizierten „Constant Phase Elements“ (CPE, Abb. 1-4) für die Konzentrationspolarisation zusammengefasst und so die gemessenen Spektren leicht an das Ersatzschaltbild angepasst werden [158]. Das CPE ist ein virtuelles Bauelement, das eingeführt wurde [159], um das Verhalten realer Systeme zu beschreiben, die inhomogene Eigenschaften haben oder die durch eine Dispersion ihrer physikalischen Parameter charakterisiert sind. Diese nicht-linearen Eigenschaften sind mit einer kontinuierlichen oder diskreten Verteilung von Relaxationszeiten verbunden, die aus der Verteilung von Aktivierungsenergien resultiert [158]. Besondere Bedeutung kommt dabei dem fraktalen Exponenten  $m$  zu. Für  $m = 0.5$  ergibt sich das Warburg-Element, das ausschließlich diffusionsbegrenzte Vorgänge in der Grenzfläche beschreibt. Mögliche physikochemische Erklärungen für diesen Parameter sind die Rauigkeit der Elektrodenoberfläche, inhomogene Reaktionsraten an der Oberfläche und variierende Dicke oder Zusammensetzung einer Deckschicht. Das verwendete CPE wurde so modifiziert, dass die nicht-linearen Eigenschaften sowohl der kapazitiven als auch der ohmschen Grenzflächenelemente berücksichtigt werden. Beide Anteile werden als kontinuierlich verteilt und frequenzabhängig vorausgesetzt.

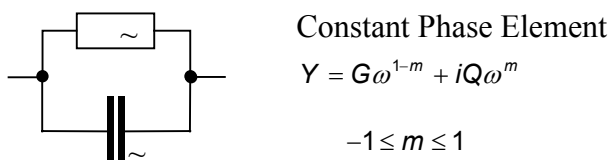


Abb. 1-4 Modifiziertes CPE.

Trotz der ausgeprägten Analogie bestehen einige Unterschiede zwischen einem elektrischen und einem elektrochemischen System, die gleichzeitig die Grenzen dieser Betrachtungsweise aufzeigen [160]. Im Gegensatz zu elektrischen Systemen, die meist aus passiven Elementen bestehen, enthalten elektrochemische Systeme oft aktive Elemente. Zudem sind elektrochemische Systeme prinzipiell nicht-linear, da die Beziehung zwischen Strom und Spannung eher exponentiell (Butler-

Volmer-Gleichung) als linear (Ohmsches Gesetz) ist. Anders als passive elektrische Systeme verändern sich elektrochemische Systeme mit der Zeit. Außerdem enthalten passive elektrische Systeme keine negativen Widerstände oder Kapazitäten wie sie z.B. beim aktiv-passiv Übergang auftreten. Um dieses Missverhältnis zu umgehen und die Eigenschaften elektrochemischer Systeme korrekt wiederzugeben, muss das nicht-ideale Verhalten durch die Einführung verteilter Bauelemente berücksichtigt werden.

### 1.2.3 Elektrochemische Reaktionen an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt

Der Zusammenhang zwischen Ladung und Stoffumsatz in einer elektrochemischen Reaktion wird durch das FARADAYSche Gesetz vorgegeben:

$$Q = znF$$

Gleichung 1

wobei  $Q$  die Ladung [C],  $F$  die Faraday-Konstante [C/mol],  $z$  die Anzahl der übertragenen Elektronen und  $n$  die Stoffmenge des oxidierten Metalls [mol] bedeutet. Faradaysche Prozesse erfordern die Übertragung von Elektronen zwischen Elektrode und Elektrolyt, deswegen werden notwendigerweise einige Substanzen reduziert oder oxidiert. Die dabei stattfindenden Reaktionen können reversibel oder irreversibel sein, was in erster Linie davon abhängt, ob durch die Redoxreaktionen neue chemische Stoffe in der Lösung entstehen. Im reversiblen Fall bleiben die Reaktionspartner an der Elektrodenoberfläche gebunden, in der Mehrheit der Lösung werden keine neuen Stoffe produziert. Wird die Stromrichtung umgekehrt, sind die Redoxreaktionen komplett reversibel. In diesen Bereich gehören z.B. die Bildung von Metalloxid und die Adsorption von Wasserstoff an die Elektrodenoberfläche. Außerdem können Änderungen in der Oxidationsstufe (insbesondere in mehrschichtigen Oxidschichten) und durch die Bildung von  $\text{OH}^-$  und  $\text{H}^+$  lokale pH-Veränderungen auftreten. Die Stärke einer solchen pH-Veränderung hängt v.a. von der Stromdichte und der Pufferkapazität der Lösung ab.

Wenn an der Redoxreaktion Stoffe beteiligt sind, die nicht an der Elektrodenoberfläche gebunden bleiben, handelt es sich um zumindest partiell irreversible Prozesse. Dazu gehören u.a. die Oxidation von organischen Molekülen sowie Vorgänge, die zu Korrosion und Gasentwicklung führen. Irreversible Reaktionen sind bei der Ladungsinjektion ins Medium prinzipiell unerwünscht, da sie die Zusammensetzung der Lösung verändern, toxische Substanzen produzieren oder extreme pH-Werte verursachen können.

Redoxreaktionen sind charakterisiert durch die Kopplung von anodischer Oxidation und kathodischer Reduktion. Dabei versteht man unter Oxidation elektronenproduzierende Prozesse, die u.a. zur Auflösung des Elektrodenmetalls, der Entwicklung von gasförmigem Sauerstoff und Chlor und zur Verschiebung zu sauren pH-Werten führen können. Im Gegensatz dazu werden während der Reduktion Elektronen verbraucht. Auf diese Art kann sich beispielsweise gasförmiger Wasserstoff bilden oder der pH-Wert in den alkalischen Bereich verschoben werden. Welche Redoxreaktionen an Anode und Kathode stattfinden, wird durch die Lage des thermodynamischen Gleichgewichtspotentials  $E_0$  für jede Reaktion bestimmt. In Tab. 1-2 sind die Gleichgewichtspotentiale für ausgewählte Elektrodenreaktionen zusammengestellt. Jedoch können, abhängig von Elektrodenmaterial und Elektrolytzusammensetzung, beträchtliche Abweichungen von diesen Gleichgewichtspotentialen auftreten.

Während die Elektrodenspannung Art und Richtung der Reaktion festlegt, wird deren Intensität – also die umgesetzte Stoffmenge – durch die Stromdichte bestimmt.

Tab. 1-2 Gleichgewichtspotentiale für ausgewählte Elektrodenreaktionen bei pH 7.0, 25°C. (↑) bedeutet Gasentwicklung [153].

Redoxreaktion		$E_0$ [V]
Eisen Auflösung/Ablagerung	$\text{Fe} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$	-0.030
Oxidation/Reduktion organischer Moleküle	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightleftharpoons 6\text{CO}_2 + 24\text{H}^+ + 24\text{e}^-$	-0.015
Wasserstoff Oxidation/Bildung	$\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	0.000

H-Atom Oxidation/Reduktion = Adsorption	$\text{Pt-H} \rightleftharpoons \text{Pt} + \text{H}^+ + \text{e}^-$	-
Oberflächenoxidation/Reduktion von Iridium	$\text{Ir} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{IrO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	0.870
	$\text{Ir} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{IrO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	0.926
	$\text{Ir}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{IrO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	0.926
Oberflächenoxidation/Reduktion von Platin	$\text{Pt} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PtO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	0.980
Platin Auflösung/Ablagerung	$\text{Pt} + 4\text{Cl}^- \rightleftharpoons [\text{PtCl}_4]^{2-} + 2\text{e}^-$	1.143
Sauerstoff Bildung/Reduktion	$2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_2 \uparrow + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	1.228
Oxidation/Reduktion von Chlorid	$\text{Cl}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ClO}_4^- + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$	1.389
	$\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ClO}_2^- + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	1.599
	$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ClO}^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	1.715
	$2\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{Cl}_2 \uparrow + 2\text{e}^-$	1.774

In inertem Gewebe ist die überwiegende elektrolytische Reaktion die Zersetzung von Wasser und darin gelöster Bestandteile. D.h. an der Anode entstehen Sauerstoff, Chlor und Wasserstoffionen, die zur Absenkung des pH beitragen. Obwohl das Gleichgewichtspotential für die Bildung von Sauerstoff kleiner ist als das für Chlor, wird letzteres aus kinetischen Gründen leichter gebildet. Der Anteil von Chlor kann maximal 50 Prozent betragen, ist im Allgemeinen aber niedriger. Der größte Anteil des Stroms wird für die Zersetzung von Wasser verbraucht [161]. Die Reaktionsprodukte verteilen sich durch Diffusion und Elektromigration in der Umgebung. Die Ausbreitung ist u.a. davon abhängig, wie viel Chlor im Gewebe bzw. im Puffer gebunden werden kann. Die toxische Wirkung von HCl und Chlor ist in der Literatur beschrieben. Man nimmt daher an, dass der Gewebe zerstörende Effekt, der in der elektrochemischen Therapie gezielt ausgenutzt wird, durch das Zusammenspiel von Wasserstoff und Chlor verursacht wird. An der Kathode wird in erster Linie Wasserstoff gebildet, was zu einer Alkalisierung der Umgebung führt. Dieser Vorgang beginnt mit der Adsorption von Wasserstoff an der Elektrode, gefolgt von  $\text{H}_2$ -Entwicklung. Jedoch bilden sich erst Gasblasen, nachdem ausreichende Mengen molekularen Wasserstoffs und Sauerstoffs vorhanden sind, um den kritischen Sättigungsdruck zu erreichen. Dieser hängt von der Elektrodengeometrie und der Pulsfrequenz ab. Eine Pulsladungsdichte, die groß genug ist, um molekularen Wasserstoff und Sauerstoff zu generieren, produziert keine Gasblasen, wenn die Pulsfrequenz langsam genug ist, um den gelösten Gasen die Wegdiffusion von der Elektrode zu ermöglichen. Zellen oder Gewebe können eine niederfrequente elektrische Stimulation tolerieren, wenn diese gepulst oder diskontinuierlich ist, jedoch nicht, wenn längere Perioden kontinuierlicher Stimulation auftreten [162].

Mit Hilfe des FARADAYSchen Gesetzes kann abgeschätzt werden, wie viel Mol Gas bzw.  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  maximal gebildet werden können. Unter der Annahme, dass die Gasentwicklung mit je 50% am Stoffumsatz beteiligt ist [161], werden bei der experimentell verwendeten Stromstärke und einer Frequenz von 1 Hz die in Tab. 1-3 angegebenen Stoffraten umgesetzt. Die Berechnungen bei verschiedenen Stromstärken zeigt Abb. 1-5.

Tab. 1-3 Maximale Umsatzrate für die Entwicklung von Gas bzw.  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  an Pt/schwarz-Elektroden, Annahme  $\text{Cl}_2$ -Ausbeute 50%,  $\text{O}_2$ -Ausbeute 50%, Frequenz 1 Hz, Stromstärke wie im Experiment.

	Anode		Kathode		
	$\text{Cl}_2$	$\text{O}_2$	$\text{H}^+$	$\text{H}_2$	$\text{OH}^-$
[nmol/min]	177	88	354	354	707

Der Gewebe schädigende Effekt, der oben beschrieben wurde, geht davon aus, dass die Reaktionsprodukte jeder Elektrode nicht miteinander reagieren. Ist der Abstand zwischen den Elektroden jedoch klein, können Hydroxylionen und Wasserstoffionen reagieren und Wasser bilden. Das würde das geschädigte Volumen eingrenzen.

Für eine Abschätzung der Diffusionsstrecken der Reaktionsprodukte kann man das Ficksche Gesetz benutzen. Bei  $37^\circ\text{C}$  und einem Diffusionskoeffizienten von  $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  werden nach 5 min, 10 min bzw. 30 min Strecken von 1.5 mm, 2.2 mm bzw. 3.8 mm zurückgelegt.

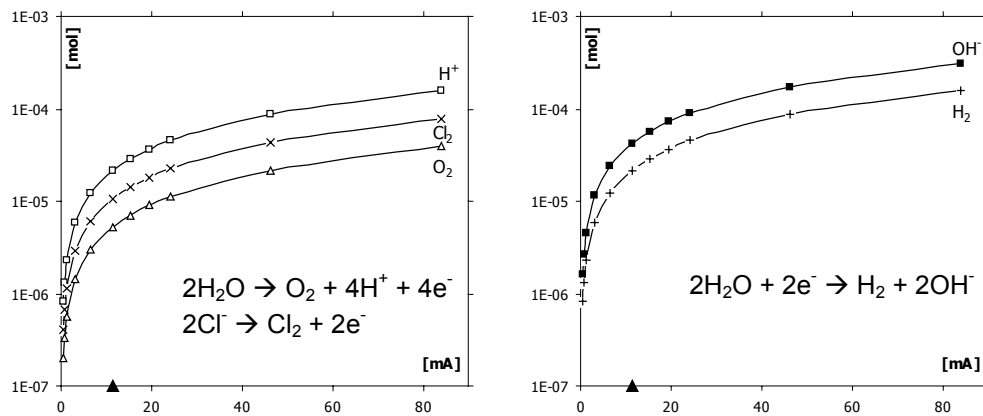


Abb. 1-5 Abschätzung der chemischen Arbeit an Anode (links) und Kathode (rechts). Umsatz nach Faraday-Gesetz, Annahme  $\text{Cl}_2$ -Ausbeute 50%,  $\text{O}_2$ -Ausbeute 50%, Frequenz 1 Hz für 30 min. Schwarzer Pfeil markiert verwendete Stromstärke bei  $U=1.5\text{V}$  an Pt/schwarz-Elektroden.

#### 1.2.4 Elektrostimulation von neuronalem Gewebe

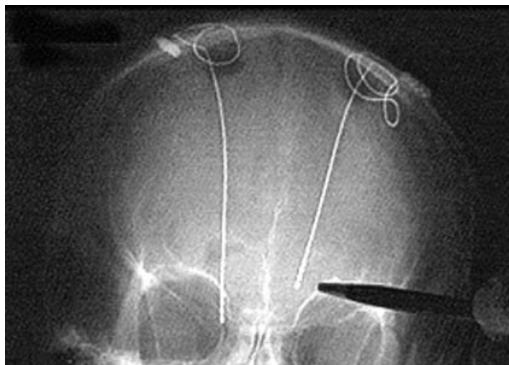


Abb. 1-6 Röntgenaufnahme eines menschlichen Kopfes mit bilateral implantierten Mikroelektroden.

Die elektrische Stimulation von tiefliegenden Kerngebieten des Gehirns wird als eine Alternative zu Lesionen bei der Behandlung motorischer Störungen eingesetzt, die u.a. bei M. Parkinson und dem essentiellen Tremor auftreten. Da die medikamentöse Therapie bei dem oft notwendigen chronischen Einsatz ihre Wirksamkeit verliert, andererseits Lesionen in bestimmten Hirngebieten in fast 40% aller Fälle schwerwiegende Nebenwirkungen wie Seh- und Sprechstörungen sowie Lähmungen hervorrufen, wird seit etwa 15 Jahren die tiefe Hirnstimulation (DBS) als Alternative eingesetzt. Dabei werden

Stimulationselektroden sehr genau im Gehirn positioniert, im Fall von Parkinson geschieht das im Nucleus subthalamicus oder Globus pallidus. Der genaue Wirkungsmechanismus der DBS ist noch nicht vollständig verstanden, man nimmt aber an, dass überaktive Nervenzellgebiete normalisiert werden und das Gleichgewicht zwischen hemmenden und erregenden Neurotransmittern wiederhergestellt wird. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das neuronale Gewebe nicht zerstört wird und die Beeinflussung der Zellen reversibel ist. Bei Anwendung über einen langen Zeitraum beobachtet man allerdings, dass die Parameter der Stimulation von Zeit zu Zeit angepasst werden müssen. Da die Therapie noch relativ jung ist, sind die Erfahrungen über Langzeiteffekte allerdings begrenzt. Elektrochemisch bedingte Nebenwirkungen sind im Gehirn jedoch besonders problematisch, da Entzündungen und Nekrosen in der Umgebung der Elektroden zur irreversiblen Schädigung des Gewebes führen. Dass bei der elektrischen Langzeitstimulation von neuronalem Gewebe auch elektrochemisch bedingte Nebeneffekte auftreten, zeigen verschiedene pathologische Untersuchungen. So berichteten Fung et al. [163], dass nach der Stimulation mit Edelmetallelektroden Eisenablagerungen im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden konnten. Henderson et al. [164] fanden Zellverlust, Depigmentierung, Bildung von Lewy-Körperchen und Gliose in der Nähe der Stimulationselektrode. Direkt an der Elektrode wurde die Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen sowie Zytoskelettveränderungen beobachtet. Diese führen nachfolgend zur Zerstörung der benachbarten Neurone.

Die Ansprüche, die man demzufolge an eine Stimulationselektrode stellen muss, enthalten kapazitive Eigenschaften. D.h. die Anzahl der Ladungen die akkumuliert und über die Grenzfläche ausgetauscht werden können, ohne dass es zu irreversiblen Redoxreaktionen kommt, soll möglichst hoch sein [155; 165]. Da für die genaue Positionierung der Elektrode im Gehirn diese gleichzeitig zum Ableiten der Aktionspotentiale genutzt wird, sollte sie überdies im gesamten wichtigen Frequenzbereich (10-1000

Hz) eine konstante und niedrige Impedanz aufweisen, um eine hohe Signalverstärkung zu erreichen. Polarisierungseffekte sollten gering sein [155; 165]. Bei gleichzeitiger Ableitung und Stimulation, besteht daher der Konflikt, beide Parametersätze nicht unabhängig voneinander optimieren zu können. Gleichzeitig sind eine Vielzahl von verschiedenen Elektrodengeometrien und –materialien für die DBS kommerziell erhältlich. Informationen über die Eigenschaften von solchen Mikroelektroden sind jedoch nicht zugänglich und speziell für den Einsatz in Tiermodellen kaum vorhanden. Obwohl Elektrochemiker seit langem Elektroden Eigenschaften untersuchen, gibt es nur wenige Arbeiten, die in echten physiologischen Medien, die verschiedene Ionen und komplexe organische Verbindungen enthalten, durchgeführt wurden. Für den gezielten Einsatz zur Stimulation sollten darum die entsprechenden Elektroden in physiologischem Medium charakterisiert werden.

## 1.3 Wirkungsweise von Feldern im biologischen Material

### 1.3.1 Elektrisches und magnetisches Feld

Für die Bewertung der elektrischen Stimulation des Knochens ist im Besonderen der Vergleich zu den physiologischen Vorgängen des „Bone Remodeling“ bedeutsam (vgl. Kap. 1.1.3). Da im Zusammenhang mit mechanischer Belastung elektrische Potentiale im Knochen gemessen wurden, geht man allgemein davon aus, dass die Feldwirkung im Knochen auf der elektrischen Komponente beruht [32; 166]. Für die Applikation von Magnetfeldern impliziert das, dass die induzierten Wirbelströme für beobachtete Effekte verantwortlich sind.

Ein äußeres elektrisches Feld wird, bedingt durch die Eigenschaften der Zelle und des umgebenden Milieus (Dielektrizitätskonstante, Leitfähigkeit), frequenzabhängig vom Zellinneren ferngehalten. In der nichtleitenden, aber polarisierbaren Membran entsteht durch das äußere Feld ein inneres Reaktionsfeld, das dem äußeren entgegengerichtet ist. Dadurch wird das Feld innerhalb der Membran und damit das Transmembranpotential beeinflusst. Das induzierte Membranpotential berechnet sich nach

$$\Delta\Psi_{ind} = 1.5E_0r \cos \alpha$$

Gleichung 2

mit  $E_0$  äußere Feldstärke,  $r$  Zellradius,  $\alpha$  Winkel zwischen äußerem und Transmembranfeld. Z.B. beträgt das induzierte Membranpotential durch eine äußere Feldstärke von 100 V/m (Zelldurchmesser 10  $\mu\text{m}$ ,  $\cos \alpha = 1$ ) 1.5 mV. Im Gegensatz dazu entsteht im leitfähigen Zytoplasma bzw. im extrazellulären Medium nur für kurze Zeit ein Feld, nämlich während des Einschaltens bzw. der Umpolung des äußeren Feldes. Durch die entsprechend ihrer Ladung im Feld bewegten Ionen wird ein Gegenfeld aufgebaut, das das äußere Feld in physiologischen Lösungen mit einer Zeitkonstante von  $5 \cdot 10^{-10}$  sec kompensiert. Daraus ergibt sich, dass das intrazelluläre Feld bei niedrigen Frequenzen vernachlässigt werden kann. Ab etwa 1 MHz wird die Membran kapazitiv gebrückt und das äußere Feld kann relativ ungehindert in die Zelle eindringen. Änderungen des Membranpotentials spielen bei hohen Frequenzen keine Rolle mehr.

Die von einem veränderlichen Magnetfeld induzierten Wirbelströme treten in geschlossenen Schleifen auf und können daher nicht durch Ionen ausgeblendet werden. Die durch bewegte Ladungen induzierten Magnetfelder sind durch die geringe Leitfähigkeit von Gewebe bei niedrigen Frequenzen klein. Leitfähige Verbindungen wie Gefäßsysteme oder Zell-Zell-Verbindungen können allerdings Bereiche erhöhter Leitfähigkeit schaffen, die zu deutlich höheren Stromdichten führen.

### 1.3.2 Energetische Überlegungen

Um die energetische Wirkung elektromagnetischer Felder auf ein biologisches System einzuschätzen, muss man das *Grotthaus-Drapersche* Prinzip beachten. Danach ist nur der Anteil der eingestrahlten Energie wirksam, der vom System absorbiert wird. Feldeffekte können nur dann auftreten, wenn die absorbierte Energiemenge die natürlichen Schwankungen des biologischen Systems übertrifft. Verglichen wird mit der Energie des umgebenden thermischen Rauschens  $kT$ . Das thermische

Rauschen ist jedoch ein zufällig wirkender Stimulus, während künstliche elektromagnetische Felder in Bezug auf Richtung und Intensität meist räumlich und zeitlich periodisch auftreten. Gegenüber dem thermischen Rauschen wird auf diese Weise die enthaltene Information gewissermaßen verstärkt. Außerdem könnten EMF spezifisch an molekulare Resonanzfrequenzen oder zelluläre Signalkaskaden ankoppeln und so die durch  $kT$  vorgegebene Energieschranke umgehen.

Von Weaver und Astumian wurden Abschätzungen zur Detektionsschwelle elektrischer Felder vorgenommen [167; 168]. Eine zelluläre Reaktion auf ein äußeres elektrisches Feld setzt voraus, dass das Feld Veränderungen hervorruft, die größer als zufällige Schwankungen sind. Da es an der Membran verschiedene Quellen für Fluktuationen gibt (thermisches Rauschen,  $1/f$ -Rauschen, „shot noise“ durch zufälliges Öffnen und Schließen von Ionenkanälen, physikalisches und biologisches Hintergrundrauschen), muss eine Zellreaktion mindestens das thermische Rauschen übertreffen. Für eine typische langgestreckte Säugerzelle wird die Schwelle  $E_{\min}$  für das Breitband-Rauschen angegeben mit

$$E_{\min} = \frac{2(\delta U)_{kT}}{L_{\text{cell}}} = 2\sqrt{\frac{2kTd}{\pi\epsilon_0\epsilon_m}} \frac{1}{r_{\text{cell}}^{1/2} L_{\text{cell}}^{3/2}}$$

Gleichung 3

( $\delta U$  induzierte Änderung des Membranpotentials,  $r_{\text{cell}}$ ,  $L_{\text{cell}}$  Radius und Länge der Zelle,  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_m$  Dielektrizitätskonstante des Vakuums und der Membran,  $d$  Membrandicke,  $k$  Boltzmannkonstante,  $T$  Temperatur  $\approx 310$  K). Mit  $r_{\text{cell}} = 10\mu\text{m}$  und  $L_{\text{cell}} = 50\mu\text{m}$  erhält man für die minimale Feldstärke **2 V/m**. Durch die Annahme einer zeitlichen Mittelung des Signals könnte ein periodisches Signal, das über  $n$  Zyklen appliziert wird, die Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses um Faktor  $\sqrt{n}$  bewirken. Beispielsweise würde eine Frequenz von 1 kHz für 10 min angewendet, die minimale Feldstärke um 3 Größenordnungen herabsetzen. Im Bereich solcher geringen Feldstärken wurden von McLeod et al. Effekte gefunden [169]. Eine weitere Verstärkung ist vorstellbar, wenn man die Größe von Zellaggregaten betrachtet, die durch Gap Junctions elektrisch verbunden sind [147]. Dann würde sich bei einer verbundenen Zellzahl  $N$  das Signal-Rausch-Verhältnis um den Faktor  $L_{\text{aggregat}} / L_{\text{cell}} \approx \sqrt[3]{N}$  verbessern. Da außerdem die Kapazität des Zellaggregats größer ist, lässt sich das Rauschen zusätzlich um den Faktor  $C_{\text{aggregat}} / C_{\text{cell}} \approx \sqrt{N}$  reduzieren [168]. Damit wäre die gesamte Verstärkung durch einen Zellkomplex fast proportional zur beteiligten Zellzahl  $A \approx \sqrt[3]{N} \sqrt{N} \approx N^{5/6}$ .

Nach dieser Abschätzung sollte es mit Feldstärken, die sich 1-2 Größenordnungen über dem Grenzwert von 2 V/m befinden (100-200 V/m), auf jeden Fall möglich sein, Effekte zu registrieren, die auf Änderungen des Transmembranpotentials zurückgehen. Da die gleichartigen Wirkung mechanischer und elektrischer Stimulation auf das „Bone Remodeling“ elektrokinetische Hypothesen glaubhaft macht, erscheint der Einsatz monopolarer Pulse sinnvoll. Die verwendeten Frequenzen sollten für die Imitation physiologischer Belastungen im Bereich von 1-100 Hz liegen.

Selbst unter der Voraussetzung, dass keine Verstärkungsmechanismen zum Tragen kommen, sind Feldeffekte über mehrere Größenordnungen der Feldstärke vorstellbar. Berücksichtigt man weiterhin den Bereich möglicher Frequenzen, Expositionszeiten und zellulärer Parameter, die beeinflusst werden können, ergibt sich eine immens große Zahl von möglichen experimentellen Bedingungen [168]. Wenn es keinen Anhaltspunkt dafür gibt, welcher potentielle Mechanismus die biologische Wirkung vermittelt, müssten eine Vielzahl experimenteller Bedingungen über einen Screening-Prozess getestet werden. Um die Anzahl der notwendigen Versuche zu reduzieren, ist es daher wichtig, Schlüsselparameter zu finden und sich auf die Erfassung primärer zellulärer Signale zu konzentrieren.

## 2 Zielstellung

Die elektrische Stimulation von Zellen und Geweben wird seit langem und bei vielfältigen Indikationen klinisch eingesetzt. Dazu gehört die Behandlung von Knochenbrüchen ebenso wie die Schmerztherapie, die muskuläre Stimulation und die Behandlung motorischer Störungen wie bei M. Parkinson. Die Basis für die therapeutische Anwendung der Elektrostimulation bei der Behandlung von Knochenbrüchen liegt in der Existenz von belastungsabhängigen elektrischen Potentialen im Knochen. Durch extern applizierte elektromagnetischer Felder soll das zeitliche und räumliche Muster endogener Felder imitiert werden. Die Mechanismen der zellulären Wirkung sind aber trotz zahlreicher Studien und langjähriger klinischer Anwendung noch immer unverstanden. Daher werden zur elektrischen Stimulation Felder mit den unterschiedlichsten Parametern eingesetzt, die in Frequenz, Feldstärke und Wellenform sowie Applikationsart und Anwendungsdauer variieren. Die Optimierung der Parameter gestaltet sich schwierig, da mitunter widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden und verschiedene Applikationsanordnungen kaum miteinander zu vergleichen sind. Die Suche nach den Mechanismen der Feldwirkung wird zusätzlich verkompliziert durch die verschiedenen Arten der Feldapplikation und den damit verbundenen Folgerungen für Feldstärke und Wellenform im Gewebe. Ausreichend hohe Feldstärken und eine gute Kontrolle über die Wellenform können nur durch die direkte Feldapplikation mit Hilfe von Elektroden erzielt werden. Dabei muss jedoch ein Kompromiss zwischen den positiven Heilungserfolgen und den unvermeidlichen Nebenwirkungen gefunden werden. Diese wären insbesondere bei der elektrischen Stimulation von Gehirngebieten, die oft über viele Jahre erfolgt, problematisch. Daher ist es notwendig, das für die Stimulation eingesetzte System im Vorfeld zu charakterisieren.

Die Diskrepanz zwischen der ungeklärten Wirkungsweise und der etablierten klinischen Anwendung elektromagnetischer Felder zur Beeinflussung des Knochenwachstums ist der Ausgangspunkt der hier vorliegenden Arbeit. Dazu war es vorab notwendig, ein experimentelles System, bestehend aus einer Osteoblasten-Zellkultur und einer geeigneten Einrichtung zur Feldapplikation, zu etablieren und zu charakterisieren. Als Zellmodell dienten die humane Osteosarcomalinie HOS TE85 und aus Minischweinen isolierte primäre Osteoblasten. Die gewählte Elektrodenanordnung wurde mit Elektroden für die tiefe Hirnstimulation, die ebenso wie verschiedene Knochenstimulatoren kommerziell erhältlich und klinisch etabliert sind, verglichen. Durch diese Betrachtungen war es möglich, Ursache und Größenordnung von bekannten, aber unerwünschten Nebeneffekten zu klären sowie detaillierte Angaben zur effektiven Feldstärke und Feldverlauf in der Zellebene zu machen.

Da nicht klar ist, über welche zellulären Signalwege die Wirkung elektrischer Felder vermittelt wird, wurden Untersuchungen durchgeführt, die verschiedene potentielle Targetmoleküle erfassen können. Um einen möglichen Signalweg aufzuzeigen, wurde der Fokus zunächst auf den unmittelbaren Nachweis der Auslösung von Primärsignalen als Antwort auf eine Feldeinwirkung gerichtet. Dazu gehört die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die auf Einzelzellniveau erfasst wurde, und die Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP. Literaturhinweise sprechen für die Auslösung von Kalziumsignalen als Primärreaktion auf ein externes Feld. Durch solche schnellen Signale, die zeitlich unmittelbar mit der Befeldung zusammenhängen, sollte geklärt werden, ob das applizierte elektrische Feld überhaupt wirkt. Zur Weiterleitung der Signale innerhalb der Zelle existieren in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Das könnte ein Hinweis auf die Beteiligung mehrerer Signalwege sein. Daher wurden im Folgenden die Freisetzung autokriner und parakriner Signalmoleküle wie  $\text{NO}_x$  und  $\text{PGE}_2$  sowie der Redoxstatus der Zelle untersucht. Durch die Messung aktivierter Proteinkinasen (MAPK), die die Signale an den Zellkern weiterleiten und so Wachstum und Genexpression regulieren, konnte ein weiterer Schritt der zellulären Signalkaskade verfolgt werden. Schließlich wurde durch die Erfassung von Proliferation und Aktivität der alkalischen Phosphatase die Wirkung in den zellulären Effektorsystemen überprüft. Damit sollte geklärt werden, ob durch die Stimulation eine langfristige Wirkung erzielt werden kann. Diese Eigenschaft wäre für einen therapeutischen Einsatz essentiell.

Durch die Kombination der Ergebnisse aller Einzelmessungen sollte abschließend versucht werden, einen möglichen zellulären Signalweg aufzuzeigen und Empfehlungen für die therapeutische Anwendung zu geben.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Zellkultur

##### 3.1.1.1 Das Zellmaterial

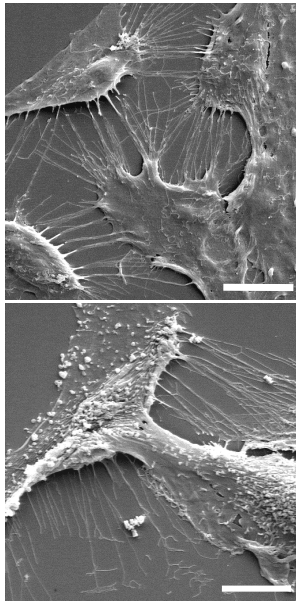


Abb. 3-1  
Rasterelektronenmikroskopische  
Abbildungen von HOS TE85  
(oben) und primären  
Osteoblasten aus dem Mini-  
Schwein (unten) in  
Monolayerkultur, Balken 10  $\mu\text{m}$ .

Humane osteogene Sarkomazellen (HOS TE-85): Die osteogene Zelllinie HOS TE-85 wurde uns freundlicherweise von der Fa. Co.don zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden routinemäßig in DMEM:HAM's F12 (1:1) kultiviert, dem 10% fetales Kälberserum (FKS), 100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 2.5 mg/ml Amphotericin zugesetzt wurden (alle Zellkulturmedien und -zusätze von Biochrom). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in humider Atmosphäre. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage unter Einsatz von Trypsin subkultiviert, jedoch höchstens bis zur 40-ten Passage. Die Verdopplungszeit liegt bei ca. 24 h. HOS TE-85 zeigen osteogene Eigenschaften und eine deutliche ALP-Aktivität. Sie stellen damit ein geeignetes Zellmodell für die Untersuchungen dar.

Primäre Osteoblasten (Mini-Schwein): Primäre Osteoblasten wurden aus dem Femur von Mini-Schweinen isoliert, die uns freundlicherweise vom Fachbereich Versuchstierhaltung der Humboldt-Universität überlassen wurden. Dazu wurde der Femur 5-10 min nach Tötung des Tieres in steriles PBS mit Streptomycin, Penicillin und Amphotericin (in den auch für die Zellkulturen verwendeten Konzentrationen) überführt. Nach der Entfernung von Knochenhaut und Knochenmark wurden die Knochen in ca. 2 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert, mehrmals mit Puffer gespült und anschließend in Zellkulturflaschen überführt oder eingefroren. Für die Kultivierung kam ebenfalls DMEM:HAM's F12 (1:1)- Medium zum Einsatz, dem jedoch 20% FKS zugesetzt wurden (Antibiotika/Antimykotikum wie oben). Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle 3-4 Tage; nach ca. 2-3

Wochen konnte erstmalig passagiert werden. Die Zellen konnten maximal bis zur 10. Passage subkultiviert werden. Der Nachweis der Identität der Osteoblasten erfolgte durch Bestimmung ihrer ALP-Aktivität. Der Umsatz des Substrates Di-Natriumphosphat lag nach 30 min bei den primären Osteoblasten mit 0.013 mM/10<sup>4</sup> Zellen im Bereich des für die HOS TE85 ermittelten Umsatzes von 0.019 mM/10<sup>4</sup> Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen wirklich um Osteoblasten handelt.

Fibroblasten L929 (Maus): Die Fibroblastenzelllinie L929, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Membranphysiologie (Prof. Dr. Fuhr), wurden routinemäßig in RPMI 1640 kultiviert, dem 5% fetales Kälberserum (FKS), HEPES 25 mM, 100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 2.5 mg/ml Amphotericin zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in humider Atmosphäre. Subkultiviert wurde ca. einmal pro Woche. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 21-24 h.

##### 3.1.1.23D-Kultur (Eingebettete Zellen)

Im Hinblick auf eine stärkere Annäherung an *in vivo* Verhältnisse wurden die Zellen in eine Collagenmatrix eingebettet. Innerhalb dieser Matrix wurden die Zellen mehrere Wochen kultiviert. Die Zellen haften dort sehr schnell an und zeigen bald eine charakteristische Morphologie begleitet von einem etwas verzögerten Wachstum. Auffälliges Merkmal der Zellen ist eine extreme Spindelform, wobei die einzelnen Zellen oft fibrillenartig aneinandergelagert sind. Diese in der 2D-Kultur ungewöhnliche Strukturierung ist vermutlich durch die Anordnung der Collagenfasern bedingt (Abb.

3-2, Abb. 3-3). Zur Veranschaulichung der Unterschiede in Morphologie und Wachstum sind im Folgenden Abbildungen von zellhaltigen Gelen (3D) und herkömmlich kultivierten Zellen innerhalb einer Monolayer (2D) gegenübergestellt (Abb. 3-3). Bei gleicher Zelldichte zum Zeitpunkt der Einsaat wird jedoch dort schon nach 2 Tagen Konfluenz erreicht.

Zur Herstellung dreidimensionaler Zellsysteme wurden 4 Teile Collagen G (Biochrom), 1 Teil 5fach konzentriertes Medium und 2 Teile einer hochkonzentrierten Zellsuspension gemischt, ausplattiert und nach dem Gelieren mit frischem Medium überschichtet. Die Zellzahl im Gel betrug ca.  $5 \cdot 10^4$ /well.

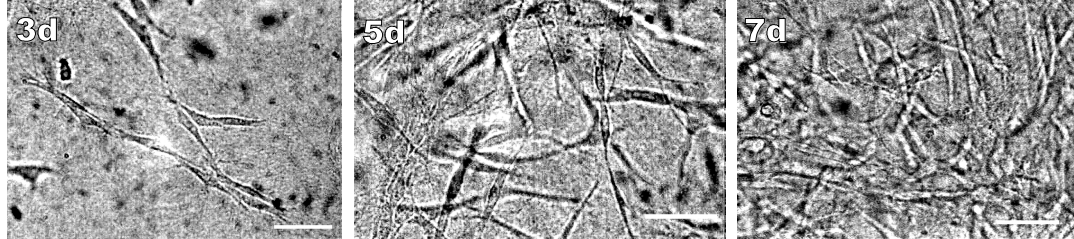


Abb. 3-2 Wachstumsverhalten von HOS nach 3, 5 und 7 Tagen, eingebettet in Collagengel. (Balken entspricht 50  $\mu$ m)

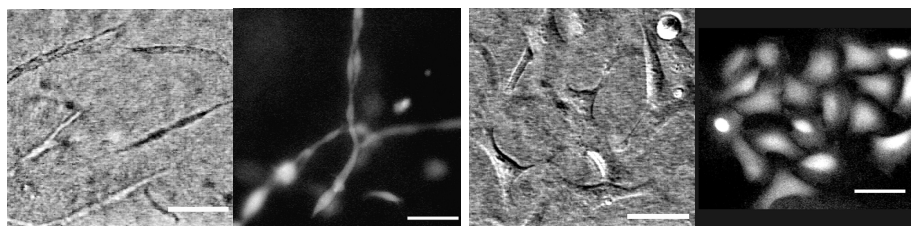


Abb. 3-3 Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von HOS. Links: im Gel, rechts: in Monolayer. (Balken entspricht 50  $\mu$ m)

### 3.1.1.3 Synchronisation der Zellen

Der individuelle Zustand der Zelle innerhalb des Zellzyklus spielt eine große Rolle bei der Stimulierbarkeit durch verschiedene Reize. Deshalb wurden verschiedene Methoden eingesetzt, um die Zellpopulation von HOS TE-85 zu synchronisieren. Um die Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen an der Gesamtpopulation zu bestimmen, wurde der DNA-Gehalt aller Proben mit Hilfe von FACS-basierten Messungen analysiert (siehe 3.1.1.4). Parallel erfolgten bei jeder Probenentnahme Vitalfärbungen mit Trypanblau. Zur Einstellung der einzelnen Zellzyklusphasen wurden verschiedenste Protokolle aus der Literatur verwendet und auf HOS-TE85 angepasst. Es wurden sowohl verschiedene Inhibitorkonzentrationen und also auch verschiedene Applikationszeiten getestet [170-176]. Außerdem fand eine Überprüfung der Reversibilität statt, indem über mehrere Stunden nach Entfernung des Inhibitors die Zellpopulation charakterisiert wurde.

Für die Synchronisationsexperimente wurden die Zellen in 24-Wellplatten mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$ /ml eingesät und einen Tag weiterkultiviert, um die Kulturen in die logarithmische Wachstumsphase zu bringen. Der normale Teilungszyklus von HOS-TE85 dauert ca. 24 h, die unbehandelte Population enthält 57%  $G_1/G_0$ -Phasen, 30% S-Phasen und 13%  $G_2/M$ -Phasen.

Folgende Standardprotokolle für die Akkumulation der Zellpopulation in verschiedenen Zyklusstadien wurden erarbeitet:

G<sub>0</sub>: HOS-Zellen wurden bis etwa 80% Konfluenz in Medium mit 10% FKS kultiviert, dann mehrfach mit Puffer gewaschen und anschließend für 24 h in Medium mit 0.1% FKS überführt. Danach befinden sich ca. 81% der Zellen in  $G_0/G_1$ .

G<sub>1</sub>: Nach der Kultivierung in Medium mit 0.1% FKS für 24 h wurden die Zellen wieder mit 10% FKS versorgt. Nach einer etwa zweistündigen Erholungsphase erfolgt der synchrone Wiedereintritt in den Zellzyklus (78%  $G_1$ ). Die Stimulation wurde 10 h nach der Zugabe von 10% FKS während der späten  $G_1$ -Phase durchgeführt.

S: Die Zellen wurden zunächst in Medium mit 10% FKS kultiviert. Anschließend wurde dem Medium 2  $\mu$ g/ml Aphidicolin zugesetzt und die Zellen 15 - 24 h darin kultiviert. Nach der Inkubation wurde mehrfach mit frischem Medium gewaschen und die Zellen wieder in normales Medium überführt. 3 h später wurde mit 85% der höchste S-Phasenanteil erreicht.

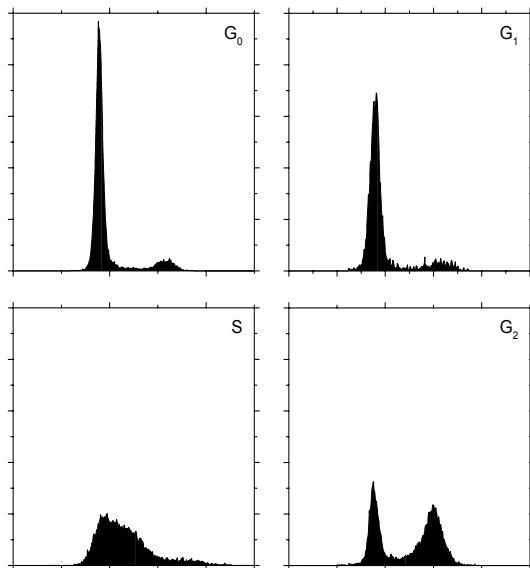


Abb. 3-4 Verteilungen der Propidiumiodid-Fluoreszenz in Populationen von HOS-TE85 nach Synchronisation.

G<sub>2</sub>/M: Nach Inkubation mit 2 µg/ml Aphidicolin für 24 h wurden die Zellen mehrfach mit frischem Medium gewaschen und wieder in normales Medium überführt. Nach einer Erholungsphase von 7 h beginnt der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase zuzunehmen und erreicht nach etwa 12 h mit 52% sein Maximum.

Die Veränderungen im Anteil der einzelnen Zyklusphasen werden z.T. auch in der Zellgröße sichtbar (siehe 3.1.1.5). Der Schwerpunkt der Verteilung verschiebt sich zu kleineren Werten, wenn der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Anteil steigt (Serumentzug) bzw. zu größeren Werten, wenn der G<sub>2</sub>/M-Anteil steigt. Dies gilt so aber nur für normale, d.h. unbeeinflusste Populationen. Bei den hier vorgestellten Methoden wird jedoch meist die DNA-Synthese und Zellteilung gehemmt, während die Proteinproduktion in den Zellen weiterläuft.

Man findet daher größere Zellen bei längerer Inhibition (Aphidicolin). Nach Aufhebung der Blockierung kann diese Verschiebung auch noch im nächsten Zyklus erhalten bleiben, nähert sich dann aber wieder den Normalwerten. Somit könnte eine Verschiebung in der Größenverteilung der Zellen Auskunft geben über die Heterogenität der Population und die Stärke der Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch den Inhibitor.

#### 3.1.1.4 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Mit Hilfe einer oder mehrerer Fluoreszenzmarkierungen können bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene erfasst werden. Dabei verhält sich die Anzahl emittierter Photonen (Intensität) proportional zur gebundenen Farbstoffmenge. Außerdem gewinnt man durch die Lichtstreuung Informationen über die Zellgröße (FSC) und die Binnenstruktur wie Granularität des Zytoplasmas und Größe des Zellkerns (SSC).

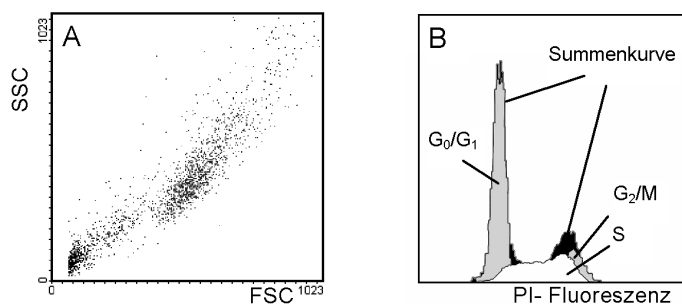


Abb. 3-5 Beispielkurven zur DNA- Analyse: (A) FSC- SSC- Plot, im Zentrum die normale Zellpopulation; (B) Histogramm- Plot für die beobachtete Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität, dargestellt ist die Lage der Subpopulationen.

Eine Analyse des Zellzyklus erfolgt am einfachsten auf Grundlage einer DNA-Quantifizierung über eine große Anzahl von Zellen. Der am weitesten verbreitete Farbstoff für die DNA-Analyse ist Propidiumiodid (PI). Es interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und hat eine sehr hohe Quantenausbeute. Da es aber auch an doppelsträngige RNA binden kann, ist es für eine optimale DNA-Analyse notwendig, die Zellen mit RNase zu

behandeln. Die hier angewandte Methode nutzt außerdem Ethanol, um die Zellen zu fixieren und die Membran für PI permeabel zu machen. Abb. 3-5 zeigt zwei typische Darstellungen einer solchen Analyse. In der Histogrammdarstellung der PI-Fluoreszenz findet man zwei deutliche Peaks, der vordere wird der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- Phase, d.h. dem einfachen DNA-Gehalt zugeordnet, der hintere gehört zur G<sub>2</sub>/M- Phase, d.h. zum doppelten DNA-Gehalt. Dazwischen liegt der Anteil der S-Phasen, d.h. derjenigen Zellen, deren DNA gerade repliziert wird.

**Fixierung:** Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren in PBS mit Kalzium aufgenommen, 3 min 500 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde unter permanentem Schütteln in ein vorbereitetes Röhrchen mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol gespritzt und für mindestens 1 h fixiert. Bei -20°C können die Zellen in 70% Ethanol für mehrere Wochen aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der PI-Färbung werden die Zellen in PBS ohne Kalzium gewaschen, der Überstand anschließend so vollständig wie möglich abgezogen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert.

**Färbung:** Zu 100 µl Zellsuspension werden 5 µl Färbelösung gegeben, die 270 µg/ml Propidiumiodid (Molecular Probes), 100 µg/ml RNase (Sigma) und 3.5% des Detergenz Saponin enthält. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben bis zur FACS- Analyse (Excitation 488 nm, Emission 630nm (FL2)) kühl und dunkel aufbewahrt [177; 178].

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Tumorimmunologie (Prof. Dr. Walden, Klinik für Dermatologie, Charite Berlin) am Zytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt.

Um eine gute statistische Auswertung und Modellierung der Histogrammkurven sicherzustellen wurden für jede Probe mindestens 10000 Ereignisse aufgenommen. Die Auswertung, einschließlich einer Korrektur für Doublets, erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.8 (freie Software, Joe Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, CA, USA). Die Anteile der einzelnen Zyklusphasen konnten mit dem Programm Cylchred 1.0.2 (basierend auf Algorithmen von Watson et al. [179] und Ormerod et al. [180] mit Modifikationen von Ormerod (1991) und Hoy (1996-99)) modelliert werden.

### *3.1.1.5 Untersuchung der Zellgröße*

Zur ergänzenden qualitativen und quantitativen Beurteilung von synchronisierten Zellkulturen wurde ein Zellzähler (CASY1 (Modell TTC), Schärfe System GmbH) verwendet. Das Gerät nutzt kontinuierliche Widerstandsmessungen, um Informationen über Durchmesser und Volumen der gemessenen Partikel zu liefern. Partikel, die die Messkapillare (60 µm) passieren, verdrängen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Die resultierende Widerstandserhöhung ist ein Maß für ihr Volumen.

### *3.1.1.6 Untersuchung der interzellulären Kopplung mittels Farbstofftransfer*

Eine verbreitete Annahme zur Wirkungsweise elektrischer Felder auf Zellen und Gewebe ist die Beteiligung interzellulärer Kommunikation. Die elektrische Kopplung von Zellen in Monolayerkultur wurde durch die Übertragung eines niedrigmolekularen Farbstoffmoleküls von Zelle zu Zelle nachgewiesen. Dabei kamen zwei verschiedene Protokolle zum Einsatz. Einerseits wurden nach Goldberg et al. [181] parallele Kulturen verwendet, wovon eine mit Farbstoff beladen wurde (Donorzellen). Nach dem Trypsinieren wurden beide Ansätze vermischt (ca. 1:50 gefärbte/ungefärbte Zellen) und in so hoher Dichte in die Messkammern eingesät, dass nach erfolgter Anheftung Konfluenz erreicht war. In einem weiteren Ansatz wurde dieses Verfahren modifiziert [182]. Die gefärbten Zellen wurden hier auf eine bereits seit 2 Tagen kultivierte, ungefärbte Monolayer (Akzeptorzellen) fallen gelassen („Parachute assay“).

In beiden Varianten wurden die Donorzellen mit 5 µM Calcein-AM (Molecular Probes) in PBS für 30 min bei 37°C gefärbt. Die Calcein-Fluoreszenz (Ex 488 nm, Em 520 nm) wurde mit dem Attofluor-Fluoreszenzmikroskop beobachtet und zwischen einer und sieben Stunden nach Beginn des Experiments Bilder aufgenommen. Sowohl in Zellkulturen, die konfluent eingesät wurden als auch in Kulturen, die über mehrere Tage bis zum konfluenten Zustand gewachsen sind, begann der Farbstoff nach kurzer Zeit von der „Donorzelle“ zur „Akzeptorzelle“ überzugehen. Abb. 3-6 zeigt Aufnahmen von Präparaten, die nach dem ersten Protokoll, das parallel trypsinisierte Kulturen verwendet, hergestellt wurden. Nach ca. einer Stunde waren jedoch erst wenige Zellen angeheftet und damit kaum Akzeptorzellen angefärbt (Abb. 3-6A). Eine deutliche Zunahme dieser „hellen Inseln“ erfolgt nach zwei Stunden (Abb. 3-6C, D). Nach mehr als vier Stunden hatte der Farbstoff auch weiter entfernt liegende Zellen, abhängig von ihrem Kopplungsgrad, erreicht (Abb. 3-6B).

Somit konnten durch beide Versuchsprotokolle funktionierende Gap Junctions in kultivierten Osteosarcomazellen HOS TE85 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war für Tumorzellen, die keine Kontakthemmung besitzen, nicht unbedingt zu erwarten, zeigt aber, dass diese Zelllinie ein gutes Modell für die interzelluläre Kommunikation darstellt.

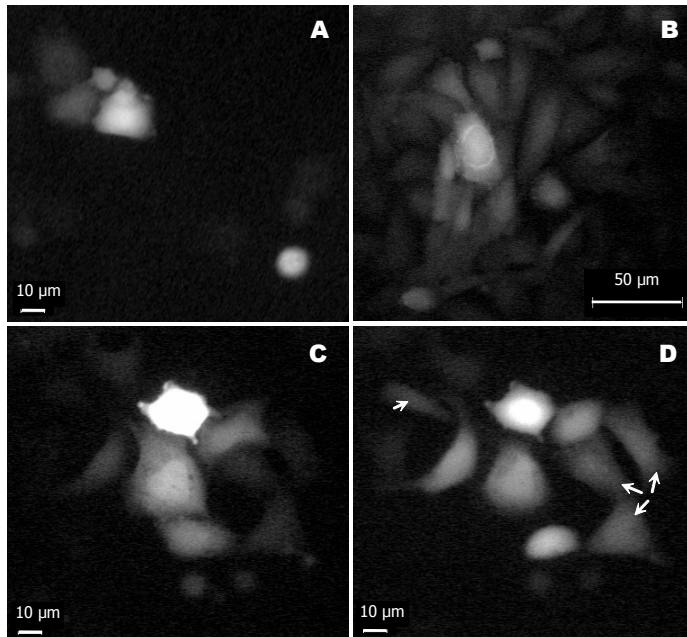


Abb. 3-6 Nachweis von Zell-Zell-Kontakten durch Calceintransfer aus einer Donorzelle (jeweils die hellste Zelle ungefähr im Zentrum des Bildes) in benachbarte Zellen. Nach 1 h beginnen die Anheftung der Zellen und die Ausbreitung des Farbstoffs (A), nach 6 h hat der Farbstoff auch entfernt liegende Zellen erreicht (B, Bilder aus verschiedenen Ausschnitten). Dynamik des Calceintransfers in identischem Ausschnitt nach 2 h (C) und nach 2.5h (D). Die Pfeile weisen auf Zellen, die im 30-minütigen Beobachtungszeitraum zunehmend angefärbt wurden.

### 3.1.2 Einzelzell- Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.1.2.1 ATTOFLUOR

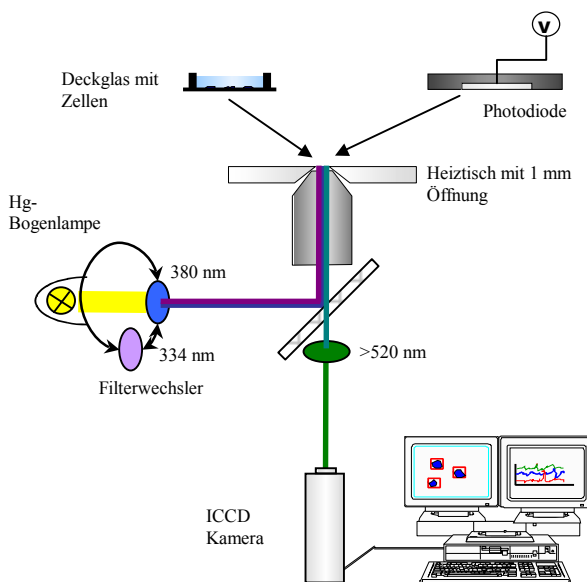


Abb. 3-7 Schematische Darstellung des Attofluor- Messplatzes.

Bildgebende Fluoreszenzuntersuchungen auf Einzelzellniveau erfolgten am *Attofluor*- System (Zeiss), welches aus einem Inversmikroskop (Axiovert 100), an das eine ICCD- Kamera und ein Rechner für Steuerung und digitale Bildverarbeitung (*Attofluor Ratiovision*) angeschlossen sind, besteht (Abb. 3-7).

Mit diesem System wurden v.a. zeitaufgelöste Messungen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, die die gleichzeitige Erfassung von intrazellulärem Kalzium und des Redoxzustandes der Zellen erlauben. Während der Versuche wurden die Proben auf 37°C temperiert und mit 5% CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre begast.

**Fura-2:** Der Kalziumsensitive Farbstoff Fura-2 (Molecular Probes) ermöglicht durch die Kombination von zwei Anregungswellenlängen

(334 nm und 380 nm) und einer Emissionswellenlänge (520 nm) Ratiomessungen, die relativ robust gegen veränderliche Farbstoffkonzentrationen, speziell auch durch Ausbleichen, die Schichtdicke des Objekts und Fluktuationen in der Intensität der Anregungslampe sind. Die errechneten Verhältnisswerte sind ein Maß für die Ca<sup>2+</sup>- Konzentration und können durch eine geeignete Kalibrierung in Absolutwerte überführt werden. Die *in vitro* Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Serie von Puffern bekannter Ca<sup>2+</sup>- Konzentration, die sich in dünnen Glaskapillaren von rechteckigem Querschnitt befanden. Die Schichtdicke innerhalb der Kapillare beträgt 50 µm und liegt damit noch etwa eine Größenordnung über der durchschnittlichen Dicke adhärenter Zellen. Da die Fluoreszenzanregung

von Fura-2 mit ultravioletterem Licht (UV) erfolgt, welches selbst die Zellen beeinflussen kann, wurde die mittlere UV-Dosis für jedes Experiment bestimmt (Kap. 3.1.2.2).

CM-H<sub>2</sub>DCFDA: CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes) ist ein Fluoresceinderivat (Ex 488 nm, Em 520 nm), dessen Fluoreszenzintensität abhängig vom Redoxzustand ist. Durch seine spektralen Eigenschaften kann es simultan zu Kalziummessungen für Mehrfachmarkierung benutzt werden.

Vorbereitung und Färbung: Für die Einzelzell-Fluoreszenzmessungen (Attofluor) wurden 3 Tage alte Kulturen trypsiniert und mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^3$  in die Messkammern eingesät, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag verwendet. Die angehefteten Zellen wurden mit Puffer (HBSS mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> und 10% FKS) gewaschen und für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Die Färbelösung (HBSS s.o.) enthielt 2 - 5 µM Fura-2/AM und/oder 5 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Anschließend wurde intensiv mit Puffer gespült. Für Doppelfärbungen wurde die Stammlösung der Farbstoffe höher konzentriert, um die Konzentration des Lösungsmittels DMSO nicht unnötig zu erhöhen.

### 3.1.2.2 UV-Dosimetrie

Die Messung der integralen Strahlungsdosis und Dosisleistung in der UV-beleuchteten Fläche erfolgte mit Hilfe einer UV-sensiblen Photodiode (190 – 950 nm) mit einer aktiven Fläche von 2.4 x 2.4 mm. Die Photodiode wurde als Photoelement geschaltet, ihre Ausgangsspannung verstärkt und gemessen. Es findet sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Ausgangsspannung und Strahlungsleistung [183].

Befindet sich die Photodiode anstelle des Objekts auf dem Mikroskoptisch, kann die integrale Strahlungsleistung der beleuchteten Fläche in der Objektebene folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Integrale Strahlungsleistung [W]} = \frac{\text{Ausgangsspannung [V]}}{\text{Wellenlängenspezifische Steigung [V/W]}}$$

Gleichung 4

Damit ergibt sich die mittlere Strahlungsleistungsdichte (SLD) in der UVA-beleuchteten Fläche

$$\text{mittlere SLD [W/m}^2\text{]} = \frac{\text{integrale Strahlungsleistung [W]}}{\text{UVA - beleuchtete Fläche [m}^2\text{]}}$$

Gleichung 5

Da die Strahlungsleistung und somit auch die Helligkeitsverteilung in der beleuchteten Fläche nicht homogen sind, sagt die Größe der mittleren SLD noch nichts darüber aus, welcher SLD die beobachteten Zellen wirklich ausgesetzt sind. Es ist daher eine Korrektur anhand von Helligkeitsverteilungsbildern (Helligkeitsprofil der UVA- beleuchteten Fläche) notwendig. Diese liefern zum einen das Verhältnis von Helligkeitsmaximum zu Helligkeitsmittelwert in der UVA-beleuchteten Fläche und zum anderen eine Angabe zur Helligkeitsspreizung im Gesichtsfeld der Kamera.

Dann ergeben sich für jede Wellenlänge die Extremwerte der SLD im Gesichtsfeld der Kamera aus:

$$\text{maximale SLD im Gesichtsfeld} = \text{mittlere SLD} \cdot \frac{\text{Helligkeitsmaximum}}{\text{Helligkeitsmittel}}$$

Gleichung 6

$$\text{minimale SLD im Gesichtsfeld} = \frac{\text{maximale SLD im Gesichtsfeld}}{\text{Helligkeitsspreizung}}$$

Gleichung 7

Aus dem Messtakt und der Belichtungszeit für eine Einzelmessung (250 ms) kann für jede Wellenlänge die minimale und maximale Dosis im Gesichtsfeld berechnet werden:

$$\text{minimale/maximale Dosis} = \text{Gesamtbelichtungszeit} \cdot \text{minimale/maximale SLD im Gesichtsfeld}$$

Gleichung 8

Die gesamte minimale bzw. maximale Dosis erhält man aus der Summe der beiden Wellenlängenanteile. Analog erhält man die gesamte minimale bzw. maximale Dosisleistung aus der Summe beider Wellenlängenanteile der minimalen/maximalen SLD im Gesichtsfeld.

Für die Dosisbestimmung in den Einzelexperimenten wird jedoch standardmäßig die gesamte mittlere Dosis bzw. die gesamte mittlere Dosisleistung angegeben, die sich aus dem Mittel des entsprechenden Minimal- und Maximalwerts ergeben [183].

### 3.1.2.3 Untersuchung der Mitogen aktivierten Proteinkinase

Im Unterschied zu den oben beschriebenen Messungen an vitalen Zellen, erfordert diese immunofluorometrische Methode die Fixierung der Zellen. Daher wurden die Zellen direkt im Anschluss an eine 10-minütige Befeldung fixiert.

Die Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) wird über eine mehrstufige Signalkaskade aktiviert. Die Untertypen ERK1/ERK2 (auch bekannt als p44/p42) werden speziell durch extrazelluläre Signale reguliert und reichern sich nach einer Stimulation im Zellkern an. Der verwendete Assay (Cellomics) basiert auf einer immunofluorometrischen Bestimmung der ERK-Translokation in den Zellkern. Diese kann durch die Differenz zwischen zytoplasmatischer und nuklearer Fluoreszenzintensität auf Einzelzellniveau bestimmt werden. Positive Kontrollen wurden mit 500 ng/ml des Mitogens Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert. Der Antikörper des verwendeten Kits bindet vorzugsweise an die zweifach phosphorylierte (vollständig aktive) Form der ERK, was Kreuzreaktionen zu anderen MAPK (p38, JNK/SAPK) minimieren soll. Die Kreuzreaktivität zu anderen MAPK sowie die Bindung an nicht phosphorylierte ERK wurden durch den Hersteller überprüft.

Für die Färbung werden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ERK-spezifischen primären Antikörper und mit dem Alexa (488 nm) konjugierten sekundären Antikörper für jeweils eine Stunde. Die Kernregion konnte durch eine Parallelfärbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst identifiziert werden.

Die verschiedenen Versuchsvarianten wurden an jedem Versuchstag doppelt durchgeführt und insgesamt dreimal wiederholt. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Pilarczyk (Fraunhoferinstitut für Biomedizinische Technik, Berlin) durchgeführt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten an einem inversen Mikroskop (Olympus), das mit einer digitalen Videokamera (Orca-ER, Hamamatsu) ausgestattet und mit einem Computersystem verbunden ist.

## 3.1.3 Fluorometrische und spektrometrische Untersuchungen von Zellpopulationen

### 3.1.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die Einsaat in Multiwellplatten erfolgte nach 2 verschiedenen Protokollen. Für Messungen über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen mit einer Dichte von  $3 \cdot 10^4$ /well (HOS, L929) bzw.  $1 \cdot 10^4$ /well (OB) ausplattiert, weitere 2 Tage kultiviert und anschließend befeldet. Für kurzfristige Messungen wurden die Zellen gleich mit der vierfachen Dichte ausplattiert und nach erfolgter Anheftung (ca. 4 h) weiterbehandelt.

### 3.1.3.2 Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP)

Grundlage dieses Assays zur Bestimmung der ALP-Aktivität ist ein colorimetrischer Nachweis von umgesetztem Substrat. Das Enzym hydrolysiert das Substrat p-Nitrophenylphosphat und bildet p-Nitrophenol und anorganisches Phosphat. Unter alkalischen Bedingungen wird p-Nitrophenol zu einem gelben Komplex umgesetzt, dessen Absorptionsmaximum bei 405 nm liegt. Die Farbintensität der Probe ist proportional der Phosphataseaktivität. Verwendet wurde ein Assay (Sigma kit 104) zur Endpunktbestimmung der ALP-Aktivität nach 15 min Inkubation bei 37°C.

Für die Bestimmung von einzelnen Proben wurden 25 µl Zellsuspension mit 125 µl Assay- Puffer und 125 µl Substrat inkubiert und die Reaktion nach 15 min durch Zugabe von 2.5 ml 0.05 N NaOH beendet. Die Messung erfolgte im Spektrophotometer (Shimadzu UV 1202, Küvetten, d = 1 cm) bei 405 nm. Um diesen Assay auch im Microplatereader (Fluostar Optima, BMG) einzusetzen, mussten einige Anpassungen vorgenommen werden: Die Zellen wurden in 96 well- Platten eingesät und nach

erfolgter Anheftung wurde das Medium abgezogen. Die Inkubation erfolgte mit 40 µl Puffer und 40 µl Substrat für 15 min, beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl 1 N NaOH. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde 1, 5, 10, 15 Tage nach der elektrischen Stimulation gemessen.

### 3.1.3.3 Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Parallel zu den oben angegebenen ALP-Untersuchungen erfolgten Proliferationsmessungen über die regelmäßige Bestimmung des DNA-Gehalts. Von den Kulturen in 96well-Platten wurde das Medium abgezogen und mit 10 µl Färbelösung inkubiert. Diese bestand aus PBS mit 0.1% Saponin und 45 µg/ml Propidiumiodid. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt.

### 3.1.3.4 Extrazelluläre Bestimmung der Nitrit/Nitrat-Konzentration

Die fluorometrische Bestimmung von Nitrit im Zellkulturmedium erfolgte direkt im Anschluss an die Stimulation nach der Methode von Misko et al. [184]. Dabei reagiert 2,3-Diaminonaphthalen (DAN) unter aciden Bedingungen mit Nitrit zum fluoreszenten 1-(H)-Naphthotriazol. Um den Anteil von Nitrat in der Probe zu erfassen, muss dieses mit Hilfe des Enzyms Nitratreduktase zu Nitrit reduziert werden. Nitrat selbst reagiert nicht mit DAN, so dass die Nitritspezifität der Farbreaktion gegeben ist. Für die Bestimmung von Nitrit im Zellkulturmedium wurde DMEM ohne Phenolrot und ohne weitere Zusätze verwendet, da sowohl Phenolrot als auch Serum die Fluoreszenzintensität bis zu 70% verringern.

20 µl der Probe wurden mit 40 µM NADPH (Enzym Cofaktor von Sigma) und 14 mU Nitratreduktase von *Aspergillus niger* (Boehringer) in einem Endvolumen von 50 µl in 20 mM Tris, pH 7.6 bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Verdünnung mit 50 µl Aqua dest. gestoppt, gefolgt von der Zugabe von 10 µl DAN (50 µg/ml in 0.62 M HCl, Sigma). Nach sofortigem Vermischen wurde 10 min im Dunklen und bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 14 µl 1N NaOH wird die Reaktion beendet und die Intensität des entstehenden Fluoreszenzsignals maximiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte sofort im Anschluss (Excitation 360 nm, Emission 460 nm). Die Nitritstandards (Reinheit > 98% von Sigma) wurden ebenso wie alle anderen Lösungen für jeden Versuchstag frisch präpariert und während des Versuchs auf Eis gehalten. Aus den Nitritstandards (10 nM – 10 µM), den NADPH zugesetzt wurde, kann nach Subtraktion des Enzymleerwerts (Nitratreduktase und NADPH) der Nitritgehalt der Probe berechnet werden.

### 3.1.3.5 Extrazelluläre Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Der verwendete Assay (Molecular Probes Kit 12212) basiert auf dem fluorometrischen Nachweis von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) mit Hilfe von Amplex Red. Dieses reagiert in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase (HRP) in einer 1:1-Stöchiometrie mit  $H_2O_2$  und bildet das fluoreszente Resorufin (Absorption 563 nm, Emission 587 nm). Die untere Auflösungsgrenze dieser Reaktion liegt bei etwa 50 nM  $H_2O_2$ .

Zur Bestimmung der Menge an  $H_2O_2$  im Medium wurden die Zellen in 100 µl Krebs- Ringer- Phosphat-Glucose- Puffer (145 mM NaCl, 5.7 mM  $Na_3PO_4$ , 4.68 mM KCl, 0.54 mM  $CaCl_2$ , 1.22 mM  $MgSO_4$ , 5.5 mM Glucose, pH 7.35) mit 50 µM Amplex Red und 1 U/ml HRP bei 37°C inkubiert. Damit beginnt die Amplex Red Reaktion, die über mehrere Stunden durch Fluoreszenzmessungen (Excitation 540 nm, Emission 590 nm) verfolgt werden kann. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Zellen im Brutschrank (37°C) gehalten. Die Stammlösungen wurden in 50 mM Natriumphosphat- Puffer, pH 7.4 angesetzt und für jeden Versuchstag frisch präpariert. Die Standardkurve wurde mit  $H_2O_2$ -Konzentrationen von 50 nM – 5 µM in Natriumphosphat- Puffer angefertigt.

### 3.1.3.6 Immunometrische Bestimmung der Konzentration von cAMP, cGMP und $PGE_2$

Diese Untersuchungen erfolgten mittels enzymgekoppelter, kompetitiver Immunoassays (Assay Designs Inc.), die die Konzentration von zyklischen Nukleotiden in lysierten Proben bzw. von Prostaglandin  $E_2$  im Zellkulturmedium erfassen. Der cGMP-Test beispielsweise benutzt polyclonale



Antikörper zu cGMP, die kompetitiv an das zyklische Nukleotid oder an ein cGMP-konjugiertes Molekül alkalischer Phosphatase binden. Die Proben werden gleichzeitig mit Antikörper und Konjugat inkubiert und der Überschuss anschließend gewaschen. Danach wird mit p-Nitrophenylphosphat, dem Substrat der alkalischen Phosphatase inkubiert. Nach Stoppen der enzymatischen Reaktion wird die Absorption bei 405 nm gemessen. Die optische Dichte verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Moleküls in der Probe.

Für den Nachweis der zyklischen Nukleotide wurden die Zellen unmittelbar nach der Befeldung lysiert und die Inkubation begonnen. Im Gegensatz zu der schnellen Reaktion von diesen sekundären Signalmolekülen, erfolgt die Ausschüttung von Prostaglandinen vermutlich langsamer. Da für die Kinetik der Prostaglandinfreisetzung von Osteoblasten in Zusammenhang mit elektromagnetischen Feldern keine Literaturdaten vorlagen, bezogen wir uns auf Literaturwerte, die für Strömungseffekte an Osteoblasten gelten. Demzufolge wurde die Prostaglandinkonzentration in den Proben 6 h nach Stimulation gemessen [185].

## 3.2 Applikation der elektrischen Felder

### 3.2.1 Platinisieren der Elektroden

Die Elektroden zur Stimulation von Zellkulturen (Abb. 3-9a, c) bestanden aus Platindraht (Reinheit 99.998%), der, da er in direktem Kontakt mit Zellkulturmedium und Zellen stand, einer Vorbehandlung unterzogen wurde. Dabei wurde die Elektrodenoberfläche mit metallischem Platin überzogen und so eine fraktale Oberfläche erzeugt, die etwa  $10^6$ -fach größer ist als die des polierten Metalls. Die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche hilft jedoch, die Stromdichte in der Messkammer zu verkleinern und elektrolytische Prozesse zu minimieren.

Die Beschichtung der Platinelektroden erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die Elektrodenoberfläche mit Isopropanol entfettet und durch elektrolytisch erzeugtes  $\text{CO}_2$  gereinigt. Dieser Prozess bewirkte außerdem, dass der bei der Beschichtung entstehende gasförmige Wasserstoff nicht so stark in die sich bildende Platinschicht aufgenommen wird. Risse und Abblättern der Platinschicht können so vermieden werden. Dazu wurde 1.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung verwendet; die zu reinigende Elektrode wurde für 1 min anodisch und mit einer Stromdichte von  $1\text{mA/mm}^2$  angeschlossen. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült. Im zweiten Schritt erfolgte die eigentliche Beschichtung mit einer 31 mM Lösung von  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Der Platingehalt der Elektrolytlösung betrug 40.45%. Die zu beschichtende Elektrode wurde für 10 min kathodisch und mit einer Stromdichte von  $0.1\text{mA/mm}^2$  angeschlossen. Werden zwei Anoden verwendet, die sich beiderseits außen von der zu beschichtenden Kathode befinden, muss diese während der Galvanisierung nicht gedreht werden und die entstehende Beschichtung gelingt gleichmäßiger.

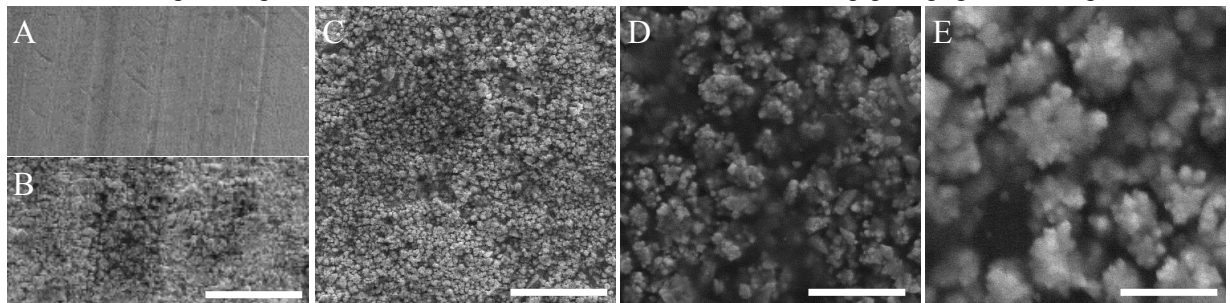


Abb. 3-8 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Platinbeschichtung. A: unbeschichtetes Platin (Balken 20  $\mu\text{m}$ ), B-D: Platinbeschichtung (Balken 10  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  bzw. 1  $\mu\text{m}$ ).

Elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach erfolgter Beschichtung (Abb. 3-8) zeigen, dass die Oberfläche der Elektroden gleichmäßig mit einer Platinschicht bedeckt ist. Durch diese Deckschicht wird die Elektrodenoberfläche tatsächlich rauer und somit deutlich vergrößert. Diese Strukturierung ist bis zur 20000-fachen Vergrößerung zu beobachten und setzt sich vermutlich fraktal fort.

### 3.2.2 Messkammern und Elektrodensysteme

#### 3.2.2.1 Elektroden zur Stimulation von Zellkulturen

Untersuchungen auf Einzelzellniveau sollen die Kinetik zellulärer Signale erfassen und die gleichzeitige Messung und Beobachtung ermöglichen. Das kann nur durch eine Elektrodenanordnung erfolgen, die eine dem Kammerboden paralleles elektrisches Feld erzeugt. Dadurch werden die Zellen zwischen den Elektroden einem homogenen Feld ausgesetzt. Untersuchungen der Elektroden Eigenschaften sind in Kap. 4.1 detailliert dargestellt.

Da unerwünschte Elektrodenprozesse mit der Höhe der angelegten Spannung zunehmen, kann diese nicht beliebig hoch werden. Eine weitere, zellverträgliche Erhöhung der elektrischen Feldstärke ist nur unter Verringerung des Elektrodenabstands möglich. So können mit einer maximalen Spannung von 1.5 V Spitzenfeldstärken von 3 kV/m in der Lösung erzeugt werden. Um einen großen Feldstärkebereich abdecken zu können, kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz:

- Platin-Elektroden-Kammer für die Applikation von Feldern im Bereich bis 200 V/m unter mikroskopischer Beobachtung (Abb. 3-9a)

In dieser Kammer wachsen die Zellen auf einem, von einem Glasrand umgebenem Deckglas. Das System wird von oben bedeckt durch einen Plexiglasblock, der die Gaszufuhr, einen Perfusionszu- und -ablauf, die platinisierten Platinelektroden ( $\varnothing$  0.5 mm) und einen Thermistor enthält. Die Elektroden haben einen Abstand von 1 cm und liegen bodenparallel auf dem Deckglas auf. Eine Beeinflussung der Temperatur ( $> 0.1$  K) durch das Feld konnte nicht festgestellt werden.

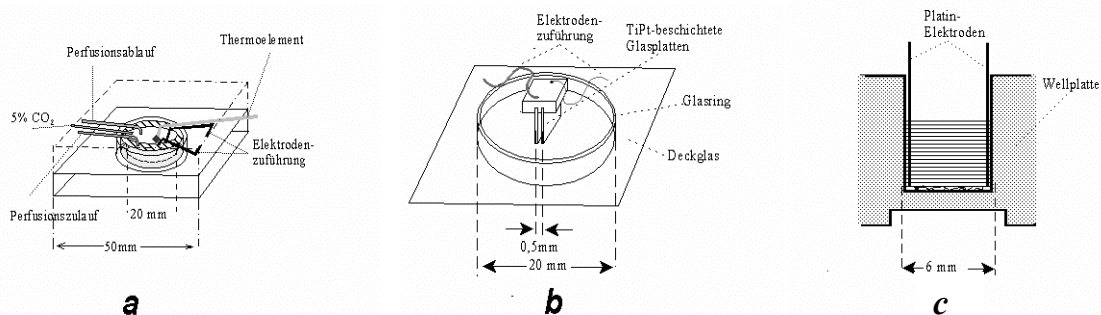


Abb. 3-9 Elektrodensysteme für die Stimulation von Zellkulturen. Für die Einzelzell-Fluoreszenzmikroskopie (a, b) und die Anwendung in Multiwellplatten (c) kamen verschiedene Anordnungen zum Einsatz (Erläuterungen im Text).

- Kammer zur Befeldung in höherem Feldbereich unter Verwendung der Mikrosystem-Technik (Abb. 3-9b)

Auch diese Kammer (wie oben) ist von einem Plexiglas-Block überdeckt (hier nicht gezeichnet), an welchem über eine Plattefeder der Elektrodenhalter befestigt ist. Die Feder drückt den hier dargestellten Elektrodenhalter auf den Boden des Deckglases. Am Elektrodenhalter sind zwei Glasplatten befestigt, die auf der Innenseite mit einer Titan-Platin-Legierung beschichtet sind. Die Glasplatten haben einen Abstand von 0.5 mm und ermöglichen damit sehr hohe Feldstärken.

Um Zellpopulationen zu beobachten, wurde ein Applikationssystem verwendet, das es ermöglicht, alle Kammern einer 96-Wellplatte gleichzeitig zu befelden. Die Messung verschiedener zellulärer Parameter erfolgt im Anschluss an die Feldapplikation. Schematisch ist die Elektrodenanordnung in einer Kavität der Wellplatte dargestellt.

- Platin-Elektrodenkammer für die Applikation elektrischer Felder in Multiwellplatten (Abb. 3-9c)

In dieser Anordnung tauchen zwei platinisierte Platin-Drähte ( $\varnothing$  0.5 mm) in jede Vertiefung der 96-Wellplatte. Die acht Elektrodenpaare einer Reihe sind jeweils miteinander verbunden. Das erlaubt die gleichzeitige Applikation von bis zu zwölf verschiedenen Feldern. Diese Anordnung ist außerdem dafür geeignet, 3D-Kulturen oder Gewebestückchen zu befelden.

#### 3.2.2.2 Mikroelektroden für die tiefe Hirnstimulation

Für die Stimulation von neuronalem Gewebe werden sowohl in der Klinik als auch in der Forschung bipolare, koaxiale Elektroden eingesetzt. Gegenstand unserer Untersuchungen waren Elektroden, die

normalerweise im Rattenmodell benutzt werden (Abb. 3-10). Die Elektroden wurden von FHC Inc., USA bzw. RMI Inc., USA bezogen. Die Eigenschaften der Elektroden wurden in Kap. 4.2 untersucht.

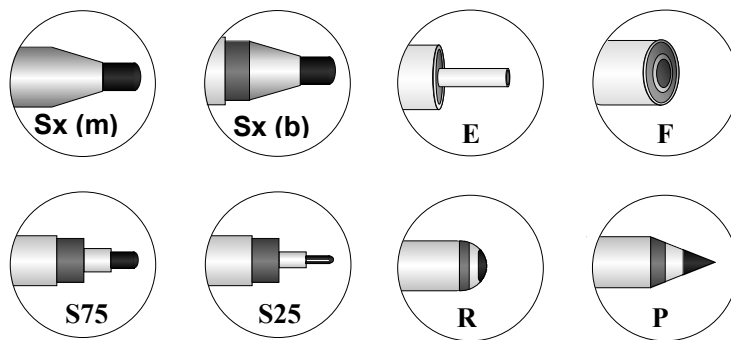


Abb. 3-10 Schematische Darstellung verschiedener Geometrien von Mikroelektroden. (S – stacked, F – flat, E – extended, R – round, P – pencil)

Der Durchmesser des Innenpols betrug je nach Geometrie 25  $\mu\text{m}$  (S25, P, R), 75  $\mu\text{m}$  (S75, E, F) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (Sx(m), Sx(b)), der des Außenpols lag entsprechend zwischen 75 und 250  $\mu\text{m}$ . Die differente Elektrode (innen) bestand aus Edelstahl oder einer Platin/Iridium-Legierung, hingegen wurde die indifferente Elektrode (außen) immer aus Edelstahl hergestellt. Die beiden Pole der

Elektrode waren durch Schichten von Epoxydharz isoliert.

Als Elektrolyt wurde neben NaCl ein künstlicher Liquor (ACSF) eingesetzt, der 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 10 mM Glucose enthielt. Andererseits wurde Astrocyten-Zellkulturmedium verwendet, das aus DMEM mit 10% FKS bestand. Der Einsatz eines einfachen und eines komplex zusammengesetzten Elektrolyten erlaubte, die Bedeutung hochmolekularer Substanzen für das Elektrodenverhalten zu bewerten. Die Leitfähigkeit von ACSF war 14.17 mS/cm und die des Zellkulturmediums 14.03 mS/cm.

### 3.2.3 Untersuchung der Elektrodeneigenschaften

#### 3.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock vorgenommen. Bei dieser Methode wird die Oberfläche der Probe von einem gebündelten Elektronenstrahl abgetastet. Die in die Probe eindringenden Elektronen lösen aus dem Anregungsgebiet Sekundärelektronen heraus, die mit Hilfe eines Detektors aufgefangen werden. Während des Abrasterns wird in Abhängigkeit von der Topologie der Oberfläche aus dem Detektorsignal ein plastisches Abbild der Oberfläche erzeugt.

Verschiedene neue und gebrauchte Mikroelektroden wurden mit einer dünnen, leitfähigen Goldschicht besputtert. Bei den platinisierten Platinelektroden war dieser Schritt nicht notwendig. Die Proben wurden anschließend mit variabler Vergrößerung zwischen 70fach und 20000fach gescannt.

#### 3.2.3.2 Strom-Spannungskennlinie

Das zeitliche Verhalten von Strom und Spannung wurde durch parallele Strom-Spannungsmessungen über einem Messwiderstand, der in seiner Größe dem Kammerwiderstand angepasst wurde, untersucht. Zusätzlich wurden am Impedanzmessplatz HP 4194A (s.u.) Messungen mit variablem Potential und fixer Frequenz durchgeführt.

#### 3.2.3.3 Impedanzspektroskopie

Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht darin, dass ein Bereich von verschiedenen experimentellen Zeitachsen innerhalb eines Experiments bestimmt werden kann, indem die Impedanz des Systems über einen entsprechenden Frequenzbereich gemessen wird.

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur mit dem Impedanzmessplatz HP 4194A aufgenommen, der über einen Computer angesteuert wurde. Die Messungen wurden im Frequenzbereich von  $10^2$  bis  $4 \cdot 10^7$  Hz vorgenommen. Die Amplitude des Wechselspannungssignals betrug 10 mV. Da die Impedanz über eine selbstabgleichende Brücke gemessen wird, ist die Messung in diesem Modus nahezu stromlos. Außerdem wurden Messungen mit überlagerter Offsetspannung (DC Bias) durchgeführt, um die Stromdichteabhängigkeit der Impedanz zu bestimmen.

Nichtlineare komplexe Kurvenanpassungen der gemessenen Impedanzspektren an einen elektrischen Ersatzschaltkreis wurden mit dem Programm LEVM vorgenommen. Das benutzt den Levenberg-Marquardt Algorithmus und erlaubt die Einführung verschiedener realer und virtueller Bauelemente.

#### 3.2.3.4 Numerische Modellierung des Feldverlaufs

Zur dreidimensionalen Modellierung des Feldverlaufs in unmittelbarer Nähe der Elektroden wurde das Programmpaket MAFIA (Solution of Maxwell's Equations by the Finite Integration Algorithm, CST GmbH, Darmstadt) verwendet, welches die Maxwell-Gleichungen in diskretisierter Geometrie mittels der finiten Integrationstechnik (FIT) löst. Wesentlich dabei ist die Verwendung zweier zueinander dualer Gitter, was die Berechnung von Potentialen und Flüssen erlaubt. Für die Berechnungen kam das Modul Elektro- Quasistatik zum Einsatz, das die Berücksichtigung frequenzabhängiger Materialkonstanten erlaubt.

Dreidimensionale Modelle der Elektroden wurden in einer homogenen und isotropen Umgebung platziert. Im Fall der Mikroelektroden war der Gewebeausschnitt um die Elektroden spitze 500 x 500 x 800 µm groß. Im Fall der platinisierten Platinelektroden wurde die Umgebung so groß gewählt, wie sie durch die jeweilige Kammergeometrie vorgegeben wurde.

Entlang der Elektrodenoberfläche wurde der Gitterabstand so klein gewählt (1-5 µm), dass das Modell rechentechnisch noch bearbeitbar war, in größerer Entfernung von der Elektrode wurde der Gitterabstand erhöht. Die Verhältnis (ratio) des größten zum kleinsten Gitterabstand wurde jedoch, um Fehler in der Kalkulation zu minimieren, auf 32 begrenzt.

Es wurde mit offenen Randbedingungen und einer Rechengenauigkeit von  $1 \cdot 10^{-16}$  gearbeitet. Es wurde vorausgesetzt, dass die Strom-Spannungs-Kennlinie linear und das Medium homogen und isotrop sei.

#### 3.2.4 Befeldungsprotokoll

Ausgehend von der Annahme, dass es ausgewählte Stimulationsfrequenzen gibt, auf die die untersuchten Zellen besonders empfindlich reagieren, diese jedoch nicht bekannt sind, wurde bei den meisten Untersuchungen ein sehr breiter Frequenzbereich gescannt. Dieser reichte von 0.1 Hz bis 100 kHz. Der untersuchte Frequenzbereich lässt sich grob in einen niederfrequenten Anteil, der den Bereich von einigen mHz bis etwa 100 Hz umfasst, und einen höheren Anteil von 1 kHz bis 100 kHz unterteilen. Ersterer wird im Folgenden als niederfrequenter Bereich bezeichnet, letzterer als hochfrequenter Bereich. Im niederfrequenten Bereich kamen vor allem monopolare Pulse, in geringerem Umfang Sinusfelder zum Einsatz. Im hochfrequenten Bereich wurden hingegen ausschließlich symmetrische Signale verwendet. d.h. Sinusfelder und amplitudenmodulierte Sinusfelder. Im gesamten Frequenzbereich wurde standardmäßig mit direkt eingekoppeltem Feld stimuliert, um ausreichend hohe Feldstärken im Medium zu erzeugen.

Um ein möglichst breites Spektrum von potentiellen Einflussfaktoren der Zellantwort auf die elektrische Stimulation zu erfassen, wurden in mehrerer Hinsicht verschiedene experimentelle Protokolle eingesetzt. Zum einen wurden Frequenz und Wellenform variiert (s.o.), zum anderen wurden verschiedene Zelltypen und Zellzustände getestet. Zu letzterem gehörte die Synchronisation der Zellpopulation von HOS TE85 in verschiedenen Zellzyklusstadien und die zwei- und dreidimensionale Kultivierung der Zellen.

Da zur Erklärung einer möglichen Feldwirkung verschiedene plausible Hypothesen existieren, wurden bei der Planung der Experimente unterschiedliche Herangehensweisen verwendet:

- Die Bedeutung elektrokinetischer Effekte soll durch den Einsatz von niederfrequenten Feldpulsen, die in der Feldstärke und damit der auf die Zelloberfläche ausgeübten Kraft variieren, überprüft werden.
- Wechselwirkungen von harmonischen Feldern spezifischer Frequenz mit bestimmten zellulären Prozessen sollen durch Variation der Frequenz über einen großen Bereich gefunden werden.

### 3.2.4.1 Beobachtung auf Einzelzellniveau

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auf Einzelzellniveau erfolgten mit Ausnahme des MAPK-Assays Befeldung und Messung gleichzeitig. So konnte die Kinetik zellulärer Signale erfasst und direkt mit der Feldwirkung verknüpft werden. In einer ersten Versuchsreihe wurden Untersuchungen zum Einfluss monopolarer Rechteckpulse durchgeführt. Die konstant gehaltene Frequenz von 1.5 Hz (133 ms Dauer) entspricht annähernd dem dynamischen Muster, das durch Bewegung wie Laufen erzeugt wird. Die applizierte Feldstärke wurde durch Veränderung der Elektrodenspannung zwischen 10 V/m und 3 kV/m variiert.

In einer weiteren Serie wurden modulierte elektrische Wechselfelder im Frequenzbereich von 100 Hz bis 100 kHz verwendet. Die angegebene Trägerfrequenz wurde stets mit 16 Hz und einer Tiefe von 100% amplitudenmoduliert, da es Literaturhinweise auf die besondere Wirksamkeit dieser Frequenz gibt [109; 115; 116; 186]. Zu Vergleichszwecken wurden auch einige Versuche mit unmodulierten Wechselfeldern durchgeführt. Die elektrische Feldstärke betrug für alle Versuche 200 V/m (Abb. 3-11). Um der Fragestellung nachzugehen, inwieweit oxidative Prozesse an der Zellreaktion beteiligt sind, wurde der oxidative Stress auf die Zellen in einigen Versuchen erhöht. Dies geschah durch verschiedene UVA-Belichtungsprotokolle oder durch Zugabe von radikalbildenden Substanzen (5  $\mu$ M 3-morpholinösydnonimine (SIN-1), Molecular Probes). Entsprechend den Vorversuchen zur UV-Empfindlichkeit dieser Zellen, wurden jedoch alle Versuche unterhalb der Halbwertsdosis dieser Zellen durchgeführt, die etwa bei 60 kJ/m<sup>2</sup> liegt (Abb. 5-3).

Die Einzelzell-Versuche bestanden immer aus 5min Vorlaufphase, 5min bzw. 10min Befeldung und 10min Nachbeobachtung. Der Messtakt wurde so eingestellt, dass die applizierte UV-bedingte Gesamtstrahlungsdosis konstant gehalten wurde. Eine tabellarische Übersicht über alle verwendeten Feldformen und -frequenzen und die jeweils untersuchten Messparameter befindet sich im Anhang.

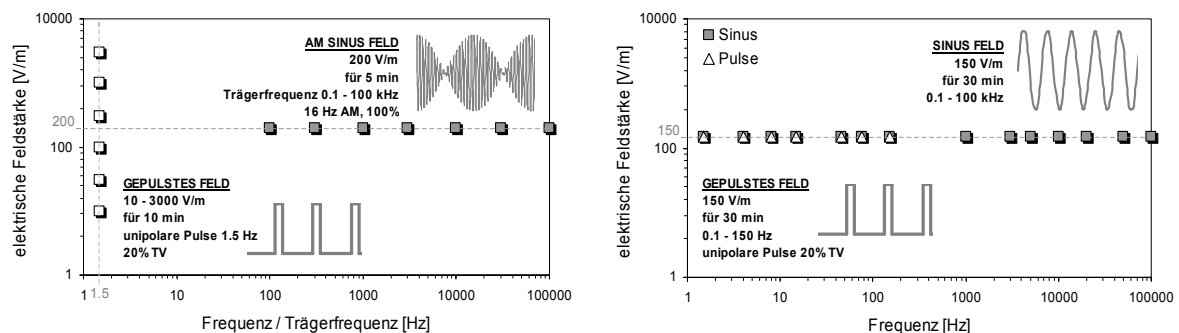


Abb. 3-11 Grafische Übersicht der verwendeten Befeldungsprotokolle für Messungen an Einzelzellen (links) und Zellpopulationen (rechts).

### 3.2.4.2 Untersuchung von Zellpopulationen

In Untersuchungen von Zellpopulationen erfolgte aufgrund der großen zu bewältigenden Probenzahlen Befeldung und Messung nacheinander. Eine direkte zeitliche Zuordnung der Effekte zum Feldeinfluss ist nur auf statistischem Wege möglich.

Die Untersuchungen umfassten den gesamten oben angegebenen Frequenzbereich von 0.1 Hz bis 100 kHz (Abb. 3-11). Im niederfrequenten Bereich wurden monopolare Pulse und Sinusfelder verwendet, im hochfrequenten Bereich wurden jedoch ausschließlich symmetrische Signale benutzt, d.h. Sinusfelder und amplitudenmodulierte Sinusfelder. Die Befeldung erfolgte immer für 30 Minuten. Während dieser Zeit befanden sich die Zellkulturen im Brutschrank, so dass Gasatmosphäre und Temperatur auf dem normalen Niveau gehalten wurden. Die Kulturplatten wurden lediglich zum Einsetzen bzw. Entfernen der Elektroden, die unter der Laminarbox erfolgten, kurz aus dem Brutschrank genommen.

Im gesamten Frequenzbereich wurde standardmäßig mit direkt eingekoppeltem Feld stimuliert, um ausreichend hohe Feldstärken im Medium zu erzeugen. Die dafür verwendeten Elektroden erzeugen ein inhomogenes elektrisches Feld im Versuchsgefäß mit Spitzen bis zu 1 kV/m in unmittelbarer Umgebung der Elektroden. Da aber in jeder Messung der Mittelwert der gesamten Population erfasst wird, gehen wir auch von einer mittleren Feldstärke aus, die 150 V/m beträgt. Diese Angaben zum

Betrag der Feldstärke beruhen auf den Ergebnissen der numerischen Modellierung der Messkammer (Kap. 4.2.4).

### 3.3 Versuchsplanung und Auswertung

Um Störgrößen, die aus der Zellkultur resultieren, zu minimieren wurden nur Zellen bis zur 30. Passage verwendet. Die Kultivierung der Zellen und Vorbereitung der Versuche (Einsaatdichte, Medien, Zeitpunkt) erfolgte nach dem angegebenen Protokoll.

In den Einzelzellversuchen erfolgte die Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe nach einem randomisierten Versuchsplan, um systematische Fehler auszuschalten. Die Normierung der Parameter, die während und nach der Feldapplikation gemessen wurden, erfolgte durch die entsprechenden individuellen Werte im Zeitintervall vor Feldapplikation.

Die Versuche in Multiwellplatten (96) sind dadurch gekennzeichnet, dass sich sowohl Kontrollen als auch alle Befeldungsvarianten gleichzeitig auf einer Versuchsplatte befinden, wobei die Anordnung der Versuchsgruppen zufällig variiert wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Varianten dreimal durchgeführt, wobei jede Einzelgruppe 8 Wiederholungen enthielt. Zur Abschätzung des Messfehlers in Multiwellplatten wurde die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der am häufigsten verwendeten Assays überprüft und als Variationskoeffizient angegeben. Die Bestimmung erfolgte indem alle 96 Kavitäten das gleiche Volumen und die gleiche Konzentration einer Lösung enthielten und jede Probe mehrfach gemessen wurde. Die erhaltenen Werte waren Ausgangspunkt zur Bestimmung von systematischem und methodischem Fehler (Tab. 3-1).

Tab. 3-1 Relative Variationskoeffizienten für die Messungen in Multiwellplatten. Angegeben sind systematische Abweichungen  $CV_{\text{syst}}$  (Mehrfachbestimmung an einer Probe), methodische Abweichungen  $CV_{\text{meth}}$  (zwischen verschiedenen Proben identischer Konzentration) und eine mittlere Abweichung  $CV_{\text{mittel}}$ , die sich aus den beiden ersten Werten zusammensetzt.

		$CV_{\text{syst}} [\%]$	$CV_{\text{meth}} [\%]$	$CV_{\text{mittel}} [\%]$
ALP	Absorption 405 nm	0.183	0.446	1.529
Propidiumiodid	Fluoreszenz 630 nm	0.631	0.281	0.806
Nitrit	Fluoreszenz 460 nm	0.642	0.523	1.692

Vorversuche an unbefeldeten Zellen zeigten überdies, dass nach 14-tägiger Kultivierung keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen den Kavitäten am Rand und in der Mitte der Multiwellplatte bestehen, die in Folge von Temperaturschwankungen oder verdunstungsbedingten Konzentrationsänderungen im Medium hätten auftreten können.

Die Auswertung der gemessenen Parameter erfolgte in allen Fällen auf die gleiche Art und Weise. Der Messwert jeder einzelnen Probe wurde auf parallel geführte Kontrollen normiert. In den Diagrammen ist der Median dieser relativen Größen mit dem dazugehörigen Standardfehler des Medians aufgetragen. Die Verwendung des Medians war angebracht, da er sich im Gegensatz zum Mittelwert als robust gegen Ausreißer erweist und für die z.T. wenigen, asymmetrisch verteilten Messwerte verlässlichere Ergebnisse liefert. Diese linksschiefe Verteilung der Messwerte ist jedoch bei biologischen und medizinischen Daten sehr häufig und muss bei der statistischen Bearbeitung des Datenmaterials berücksichtigt werden. Da also in nahezu allen Gruppen keine Normalverteilung vorliegt, ist die wichtigste Voraussetzung für die Anwendung parametrischer Testverfahren wie t-Test nicht gegeben und diese dürfen nicht angewandt werden. Es gelang auch nicht, durch eine geeignete Transformation normalverteilte Daten zu erhalten. Daher wurden in jedem Fall verteilungsunabhängige statistische Verfahren eingesetzt. Für den Vergleich unabhängiger Stichproben diente der U-Test nach Mann und Whitney, verbundene Stichproben wurden nach Wilcoxon getestet. Der U-Test ist ein Rangsummentest für ähnliche bis gleiche Verteilungsformen und das nichtparametrische Gegenstück zum t-Test. Er geht davon aus, dass die  $n=n_1+n_2$  Beobachtungen der Größe nach geordnet und von 1 bis n durchnummeriert werden. Weist die eine der beiden Stichproben im Durchschnitt kleinere Werte auf, so werden sich die Rangsummen der Stichproben unterscheiden.

## 4 Technische Ergebnisse – Eigenschaften der Elektroden

### 4.1 Charakterisierung von Elektroden für die Stimulation von Zellkulturen

#### 4.1.1 Strom-Spannungskurve der Elektroden

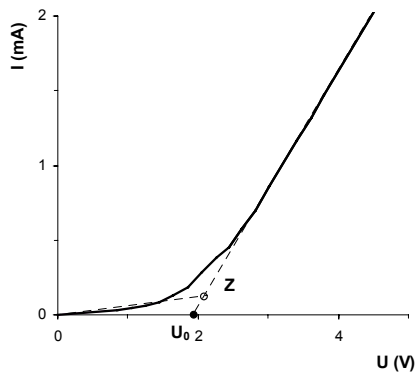


Abb. 4-1 Strom-Spannungskennlinie (DC) von Pt/schwarz-Elektroden in PBS.

Ausdruck der Polarisationserscheinungen an der Elektrodengrenzfläche ist eine nichtlineare Strom-Spannungskurve (Abb. 4-1). Diese ist gekennzeichnet durch einen charakteristischen Knick, den Zersetzungspunkt. Man erhält ihn durch Extrapolation der beiden geraden Kurvenäste. Verlängert man den ansteigenden Ast bis zur Abszisse, erhält man die dazugehörige Zersetzungsspannung der Lösung oder einer ihrer Komponenten. Enthält die Lösung mehrere Komponenten, können auch multiple Zersetzungspunkte auftreten. Werden an die Elektrode Spannungen angelegt, die kleiner als die Zersetzungsspannung sind, nimmt der Strom nicht oder nur geringfügig mit der Spannung zu. Erst oberhalb der Zersetzungsspannung verhalten sich Strom und Spannung proportional. Bei sehr großen Spannungen wird

schließlich die Durchtrittspolarisation entscheidend und die Stromstärke kann nicht weiter wachsen (Grenzstrom). Somit ist die Zersetzungsspannung ein Indiz für die vorherrschende Redoxreaktion, ihr Betrag wird aber meist durch zusätzliche Überspannungen, d.h. teilweise auch durch irreversible Vorgänge, verfälscht.

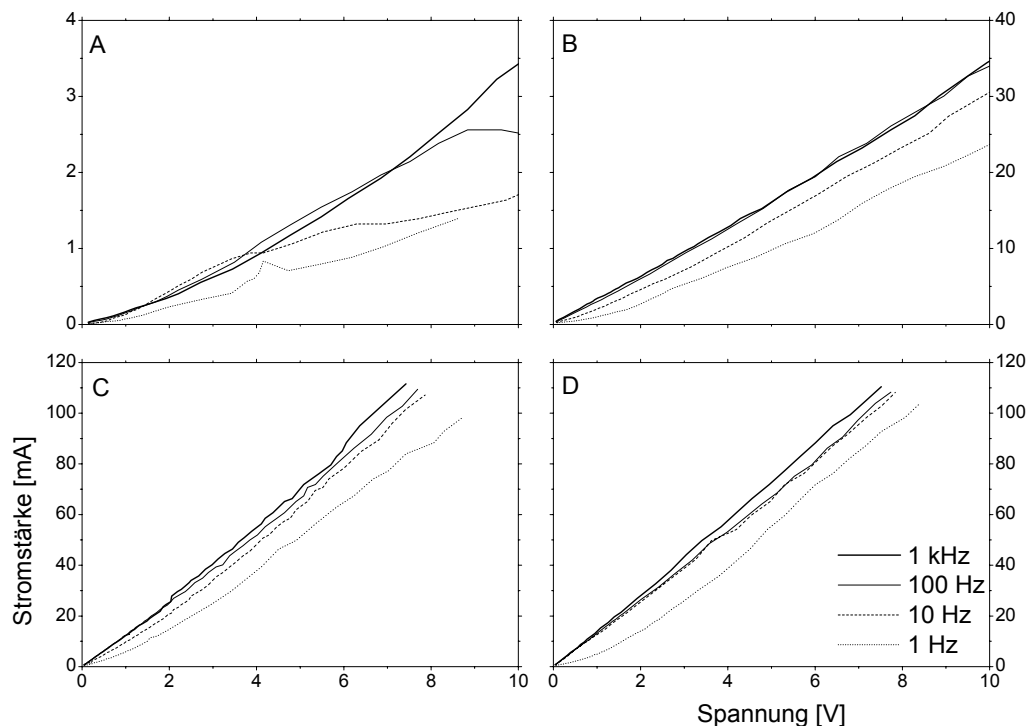


Abb. 4-2 Frequenzabhängige Strom-Spannungskennlinien von Elektroden. Oben: verschiedene Elektroden in PBS + 10% FKS. A: besputterte Ti/Pt-Elektroden, Elektrodenabstand 0.5mm, B: Pt/schwarz-Elektroden, Elektrodenabstand 1cm. Unten: Pt/schwarz-Elektroden in verschiedenen Lösungen, Elektrodenabstand 0.5cm. C: in DMEM, D: in Zellkulturmedium (DMEM:HAM's F12 1:1, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin).

Nimmt man die Elektrodenkennlinien mit Wechselstrom auf, zeigt sich, dass dieses nichtlineare Verhalten deutlich frequenzabhängig ist (Abb. 4-2). Mit zunehmender Frequenz nähert sich die Strom-Spannungs-Kurve dem Idealverhalten an, welches oberhalb von 1 kHz immer gegeben ist. Da unter den verschiedenen Polarisationsarten nur Diffusions- und Reaktionsimpedanz frequenzabhängig sind, lässt sich die Ursache für dieses Phänomen eingrenzen. Es impliziert außerdem, dass sich Unterschiede in Elektrodenmaterial und -oberfläche, aber auch Elektrodenabstand und Zusammensetzung der Lösung im Kurvenverlauf niederschlagen (Abb. 4-2 B-D).

Insbesondere die Anwesenheit polarisierbarer Makromoleküle im Elektrolyten, z.B. durch Zugabe von Serum, setzt den Einfluss der Konzentrationspolarisation herab und es wird bereits bei niedrigeren Frequenzen ein lineares Strom-Spannungs-Verhalten beobachtet (Abb. 4-3). Das zeigt sich durch konstante Werte des Polarisationswiderstands. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist die Bildung einer Proteinschicht vor bzw. auf der Elektrodenoberfläche, die den Aufbau oder Abbau einer Oxidschicht und damit das Entstehen einer entsprechenden Reaktionsüberspannung behindert. Ein erhöhter Anteil an leicht reduzierbaren Substanzen setzt den Polarisationswiderstand weiter herab.

Der starke Einfluss der Lösungszusammensetzung weist auch auf einen potentiellen Unterschied von *in vivo*- und *in vitro*- Versuchen hin, da *in vitro* meist mit physiologischen Puffern gearbeitet wird, denen in den seltensten Fällen hochmolekulare Substanzen zugesetzt werden.

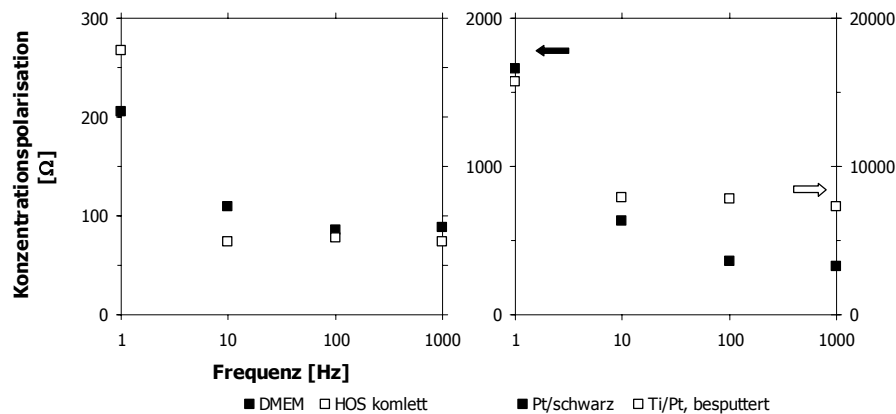


Abb. 4-3 Frequenzabhängigkeit der Konzentrationspolarisation, bestimmt aus dem Anfangsanstieg der Strom-Spannungskennlinien aus Abb. 4-2. Links: Pt/schwarz-Elektroden, Elektrodenabstand 0.5 cm in DMEM und Zellkulturmedium (DMEM:HAM's F12 1:1, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin), rechts: Pt/schwarz-Elektroden, Elektrodenabstand 1 cm und besputterte Ti/Pt-Elektroden, Elektrodenabstand 0.5 mm in PBS + 10% FKS.

#### 4.1.2 Analyse des Eingangssignals

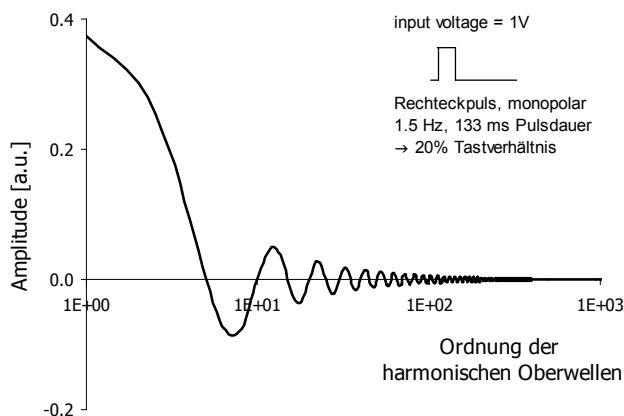


Abb. 4-4 Amplitudenspektrum des für die Stimulation von Knochenzellkulturen verwendeten Rechteckpulses nach Fouriertransformation.

Um die verschiedenen Prozesse an der Elektrode aufzuspüren, wurde das verwendete Stimulationssignal durch eine Fourierreihe beschrieben (Abb. 4-4). Die Fouriertransformation ermöglicht die Zerlegung eines beliebigen Signals in eine Summe von harmonischen Funktionen (Sinus, Cosinus). Es wird klar, dass man, um einen monopolaren Rechteckpuls mit einem Tastverhältnis (Verhältnis der Länge des eingeschalteten Zustands zur Periodendauer bei einem Rechtecksignal) von 20% zu erhalten, die Amplituden von etwa 100 Harmonischen berücksichtigen muss. Besonders für die Modellierung der steilen

Flanken sind höhere Frequenzen erforderlich. Daher erschien es hilfreich, das Verhalten der Elektroden im Frequenzbereich mittels Impedanzspektroskopie zu untersuchen.



### 4.1.3 Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Elektroden

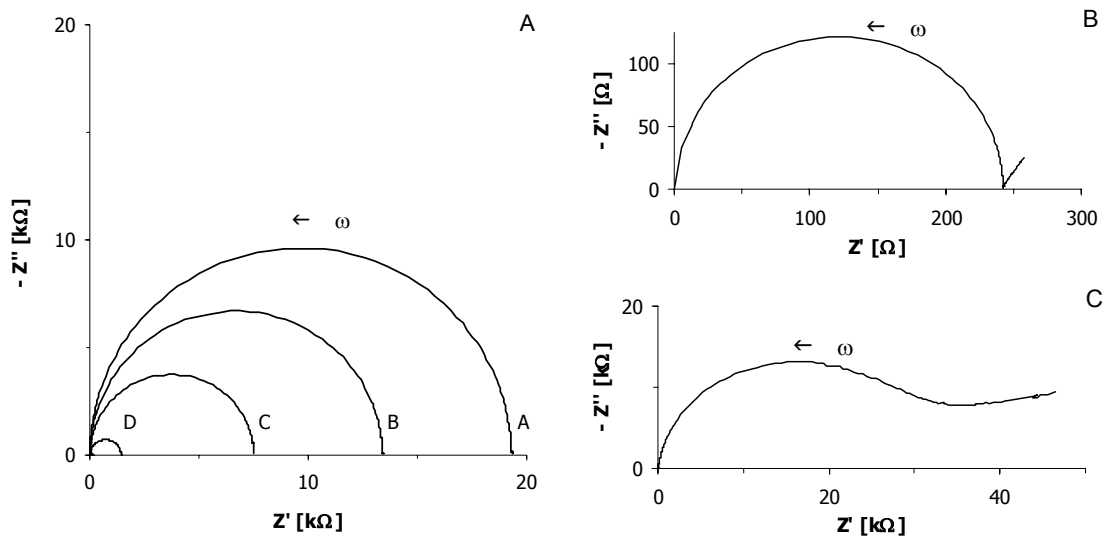


Abb. 4-5 Impedanzspektren der verwendeten Elektroden. A: Pt/schwarz in NaCl-Lösung verschiedener Leitfähigkeit (A: 185.7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , B: 510  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , C: 1.856  $\text{mS}/\text{cm}$ , D: 32.9  $\text{mS}/\text{cm}$ ), B: Pt/schwarz in PBS+10%FKS, C: Ti/Pt, besputtert in PBS+10%FKS.

Abb. 4-5A zeigt Impedanzspektren der verwendeten Elektroden in NaCl-Lösung verschiedener Leitfähigkeit. Die Kurven sind qualitativ ähnlich und werden nur durch die Leitfähigkeit der Lösung skaliert. Abb. 4-5B, C zeigen, wie sich die Spektren in physiologischer Lösung mit Serumzusatz verändern. Man kann jetzt zwei Teilbereiche unterscheiden. Der Halbkreis auf der Abszisse wird durch die Impedanz des Mediums verursacht. Im niederfrequenten Bereich geht dieser in eine Gerade über, welche die Impedanz der Elektrode repräsentiert. Die beinhaltet sowohl diffusionsabhängige Prozesse als auch Adsorption und faradayschen Stromfluss durch die Grenzfläche.

Die erhaltenen Spektren wurden über einen nichtlinearen komplexen Fit an den oben gezeigten Äquivalentschaltkreis (Abb. 1-3 und Abb. 1-4) angepasst. Der Anteil des Elektrolyten wird durch ein einfaches RC-Glied beschrieben. Die Eigenschaften der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt erfordern jedoch die Einführung verteilter Kapazitäten und Widerstände. Die Ergebnisse des Fits (Abb. 4-6, Tab. 4-1) zeigen, dass der fraktale Exponent bei den untersuchten Elektroden v.a. von der Geometrie und der Oberflächenbeschaffenheit, weniger vom Material abhängt. Die Werte in physiologischem Puffer und Zellkulturmedium zeigen kaum Unterschiede. Bemerkenswerte Unterschiede zeigen sich jedoch in der Leitfähigkeit und der Kapazität des CPE. Im Gegensatz zu den Mikroelektroden besitzen Pt/schwarz-Elektroden einen sehr kleinen Widerstand und eine große Kapazität. Bezogen auf die geometrische Größe der Oberfläche sind die Werte für beide Elektrodentypen aber gut vergleichbar.

Tab. 4-1 Anpassung der Parameter des CPE für verschiedene Mikroelektroden und für Pt/schwarz-Elektroden.

Material	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Elektrolyt	$G \cdot 10^{-4}$ [S/m]	$Q \cdot 10^{-4}$ [F]	$Q$ [F/cm <sup>2</sup> ]	$m$
Pt/Ir	25	Medium	$35 \pm 2$	$12 \pm 2$	$2.56 \pm 0.43$	$0.57 \pm 0.02$
Pt/Ir	75	Medium	$83 \pm 16$	$9 \pm 4$	$0.90 \pm 0.40$	$0.64 \pm 0.02$
Edelstahl	75	Medium	$105 \pm 27$	$10 \pm 3$	$0.93 \pm 0.26$	$0.65 \pm 0.01$
Edelstahl	100	Medium	$50 \pm 1$	$27 \pm 6$	$1.53 \pm 0.36$	$0.55 \pm 0.01$
Pt/Ir	25	Puffer	$46 \pm 4$	$10 \pm 3$	$2.15 \pm 0.69$	$0.58 \pm 0.02$
Pt/Ir	75	Puffer	$92 \pm 19$	$9 \pm 3$	$0.85 \pm 0.34$	$0.64 \pm 0.02$
Edelstahl	75	Puffer	$96 \pm 28$	$7 \pm 1$	$0.69 \pm 0.13$	$0.66 \pm 0.01$
Edelstahl	100	Puffer	$60 \pm 3$	$20 \pm 5$	$1.14 \pm 0.27$	$0.58 \pm 0.01$
Pt/schwarz	500	Medium	$(28 \pm 5) \cdot 10^4$	$(3.3 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$6.90 \pm 0.92$	$0.69 \pm 0.01$
Pt/schwarz	500	PBS + 10% FKS	$(26 \pm 2) \cdot 10^4$	$(12.2 \pm 5) \cdot 10^4$	$25.67 \pm 11.17$	$0.64 \pm 0.03$

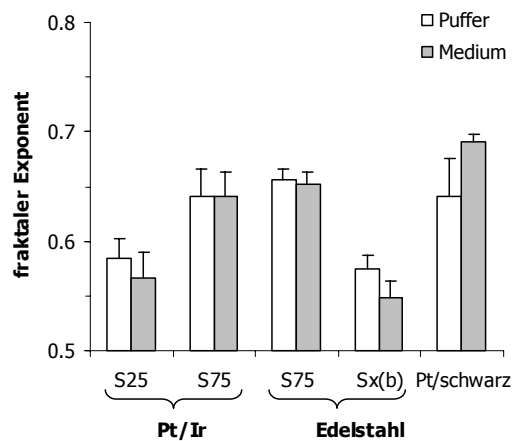


Abb. 4-6 Gefittete Werte für den fraktalen Exponenten des CPE. Vergleich von kommerziellen Mikroelektroden ( $\varnothing$  25  $\mu$ m, 75  $\mu$ m und 100  $\mu$ m) und der verwendeten Pt/schwarz-Elektrode ( $\varnothing$  0.5 mm).

Wird ein einfacher 1,1-Elektrolyt (NaCl) verwendet und dessen Leitfähigkeit variiert, ergibt sich ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den beiden Elektrodentypen. Während an der Pt/schwarz-Elektrode die Eigenschaften der Grenzfläche nahezu unabhängig von der Leitfähigkeit sind, zeigt sich bei den Mikroelektroden eine parabelförmige Abhängigkeit.

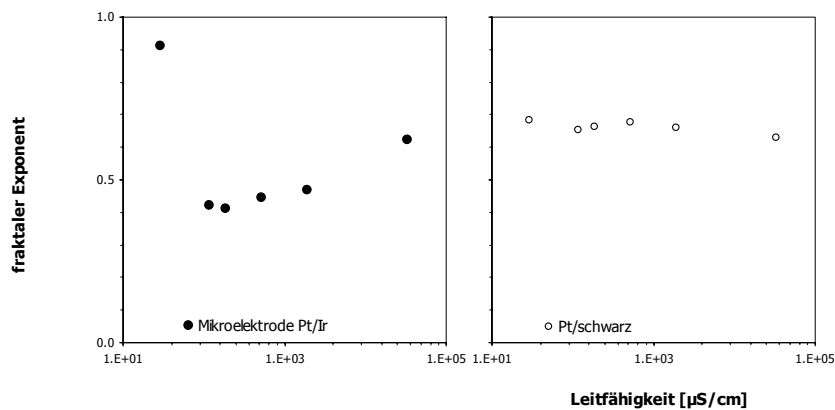


Abb. 4-7 Gefittete Werte für den fraktalen Exponenten des CPE in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit einer NaCl-Lösung. Vergleich von kommerziellen Mikroelektroden (s.o.) und der verwendeten Pt/schwarz-Elektroden.

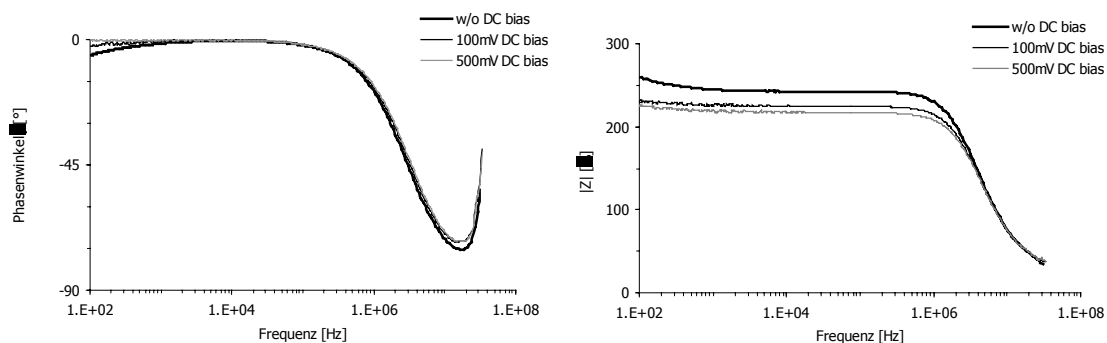


Abb. 4-8 Spektren für Betrag und Phase der Impedanz von Pt/schwarz-Elektroden bei unterschiedlichen Offsetspannungen.

Die Impedanzspektren der Elektroden verändern sich auch, wenn an das System eine Offsetspannung (DC Bias) angelegt wird. Dies äußert sich in einer Abnahme von Phasenwinkel und Betrag der Impedanz. Bei entsprechender Überspannung verschwindet der Phasenwinkel vollständig, d.h. die Elektrode kann im Frequenzbereich bis zu 100 kHz als ohmscher Widerstand betrachtet werden. Bei hohen Frequenzen, wenn die Elektrodenimpedanz gegen Null geht, sollte der Phasenwinkel  $-90^\circ$  erreichen. Vermutlich sind Induktivitäten der Anschlusskabel der Grund für Abweichungen vom Idealverhalten.

Für die Anpassung der Spektren an den Äquivalentschaltkreis ist die Einführung eines Durchtrittswiderstands und der Doppelschichtkapazität in Reihe bzw. parallel zum CPE notwendig. Betrachtet man die Ergebnisse der Anpassung, wird offensichtlich, dass sich der fraktale Exponent von Pt/schwarz-Elektroden bereits bei kleinen Offsetspannungen von 0.5 auf über 0.9 erhöht und auch bei höheren Spannungswerten in diesem Bereich bleibt. Dieses Verhalten ist zudem unabhängig

von Elektrodengeometrie und Material. Man findet jedoch einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Kapazität des CPE und der angelegten Offsetspannung (Abb. 4-9). Die Kurven zeigen beide einen Knickpunkt bei ca. 2 V und stimmen so mit den gemessenen Strom-Spannungs-Kennlinien (Abb. 4-1 und Abb. 4-2) überein. Das bestätigt einerseits die Verwendung dieses Modells und andererseits die Beschreibung der Polarisierungseffekte durch das CPE.

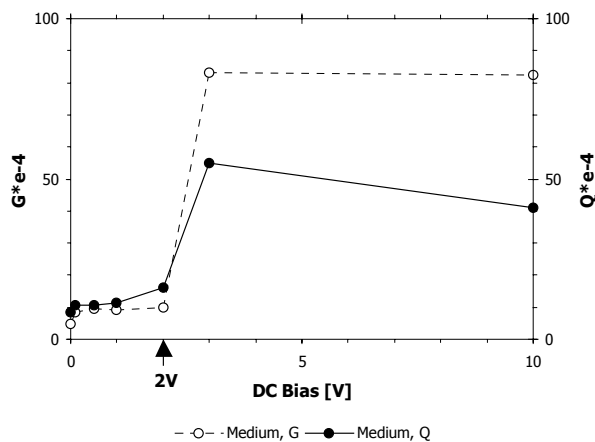


Abb. 4-9 Gefittete Werte für Leitfähigkeit (G) und Kapazität (Q) des CPE der Pt/schwarz-Elektrode in Abhängigkeit von der Offsetspannung in Aqua dest.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der Elektrode, weicht die Pulsform im Medium von der Form des Eingangssignals ab (Abb. 4-10).

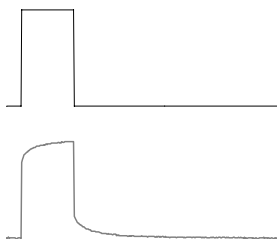


Abb. 4-10 Pulsform die von Pt/schwarz-Elektroden im Medium bei Anlegen einer rechteckförmigen Spannung erzeugt wird.

#### 4.1.4 Modellierung der räumlichen Feldverteilung

Um zu klären, wie die räumliche Feldverteilung im Medium ist, wurde die Elektrodengeometrie dreidimensional modelliert und mit Hilfe finiter Integrationstechnik (FIT) der Feldverlauf berechnet. Im Zusammenhang mit möglichen Korrosionsprozessen wurde außerdem untersucht, ob und wo lokale Inhomogenitäten der Stromdichte auftreten. Zu diesem Zweck wurde das System als linear vorausgesetzt und isotrope Umgebungsvariablen angenommen. Elektroden zur Stimulation von Zellkulturen sind relativ groß und werden in speziellen Kammern eingesetzt. Die Anordnung wurde dabei so gestaltet, dass auf Einzelzellniveau Stimulation und Beobachtung gleichzeitig erfolgen konnten und alle Zellen vergleichbaren elektrischen Feldstärken ausgesetzt waren. Deshalb wurde das Elektrodenpaar parallel zum Kammerboden orientiert, was eine weitgehend homogene Feldverteilung in der Zellebene garantiert. Extremwerte der Feldstärke treten nur direkt an und unter den Elektroden auf. Diese Bereiche wurden aber nicht für die Messung von Zellen verwendet, sondern es wurde immer ein Mindestabstand von den Elektroden eingehalten. Eine inhomogene Feldverteilung mit Maxima direkt an den Elektroden findet man bei der Elektrodenanordnung, die zur Befeldung von Multiwellplatten eingesetzt wurde. Da hier bei Messungen immer Mittelwerte der gesamten Population erfasst wurden, wurde auf eine homogene Verteilung verzichtet. So konnte die Elektrodenanordnung recht einfach gestaltet werden, indem zwei parallel Platinelektroden senkrecht in die Kavität der Multiwellplatte eintauchen. Überdies wurden die Elektroden nur innerhalb des linearen Strom-Spannungs-Bereiches angesteuert. Lokale pH-Veränderungen waren bei dieser Spannung nicht nachweisbar. Die räumlichen Verteilungen der elektrischen Feldstärke, die sich bei Anlegen eines Elektrodenpotentials von 1 V ergeben, zeigt Abb. 4-11.

Unter der Annahme, dass die Elektroden glatt sind und keine Polarisierung auftritt, würden sich folgende Eckwerte für die Verteilung der Feldstärke ergeben (Tab. 4-2). Die Bereiche der

Extremwerte, die sich direkt an den Elektroden befinden, wurden für Einzelzelluntersuchungen nicht verwendet.

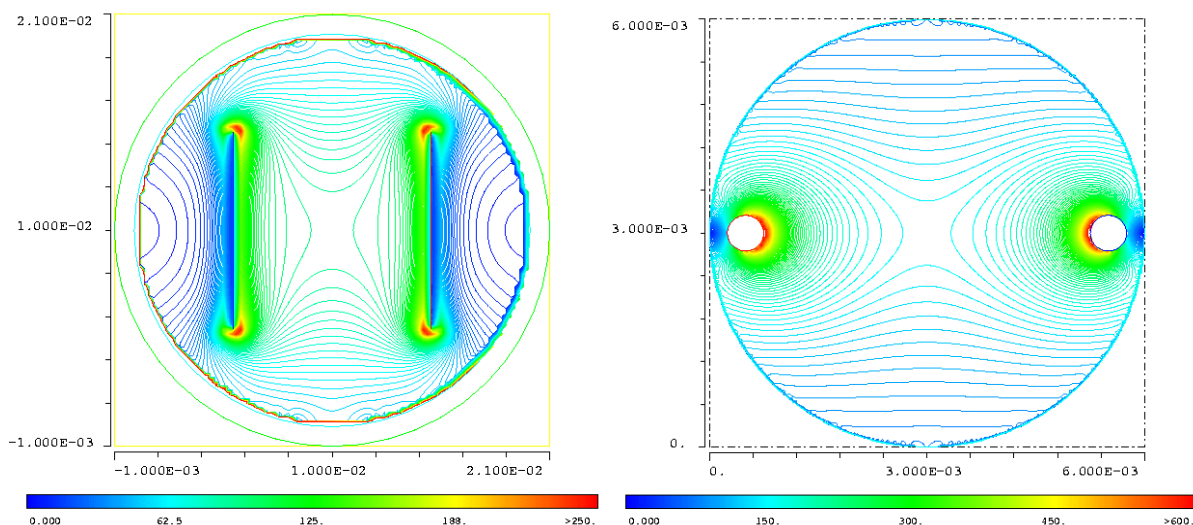


Abb. 4-11 Räumliche Verteilung (Aufsicht) der elektrischen Feldstärke in der Messkammer (Elektroden  $\varnothing$  0.5 mm, Leitfähigkeit des Mediums 1.5 S/m, Elektrodenpotential 1 V). Links: Messkammer für Beobachtungen auf Einzelzellniveau, Elektrodenabstand 1 cm. Rechts: Kavität einer 96well-Platte für Messungen von Zellpopulationen, Elektrodenabstand 5 mm.

Tab. 4-2 Elektrische Feldstärke in der Messkammer von Pt/schwarz-Elektroden (Elektroden  $\varnothing$  0.5 mm, Leitfähigkeit des Mediums 1.5 S/m, Elektrodenpotential wie im Experiment).

Material	Abstand [mm]	$\Delta\psi$ [V]	Min [V/m]	Max [V/m]	Mittelwert [V/m]
Pt/schwarz	5	1.5	0	1039	157
Pt/schwarz	10	1	0	296	85
Pt/schwarz	10	2	0	592	170

## 4.2 Charakterisierung von Mikroelektroden für die tiefe Hirnstimulation

### 4.2.1 Strom-Spannungskurve der Mikroelektroden

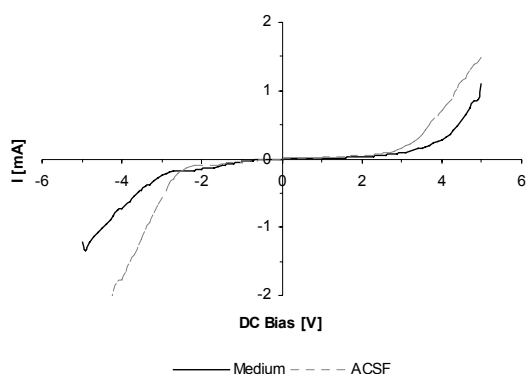


Abb. 4-12 Strom-Spannungskennlinie von Pt/Ir Mikroelektroden in verschiedenen Elektrolyten.

Die Strom-Spannungs-Kennlinie der Mikroelektroden wurde nicht bei Gleichstrom bestimmt, sondern indem die Frequenz auf die Stimulationsfrequenz fest eingestellt wurde. Auch bei diesen Elektroden ist die Kennlinie nicht linear und frequenzabhängig. Jedoch ist hier die Frequenzabhängigkeit stärker ausgeprägt als bei platinisierten Platinelektroden. Letztere zeigen bei der Stimulationsfrequenz von 130 Hz bereits lineares Verhalten. Grund dafür ist vermutlich die geringe Stromdichte, die durch die fraktale Oberflächenbeschichtung erzielt wurde.

Bedingt durch die unterschiedlichen Materialien und Oberflächengröße von innerem und äußerem

Pol ist die Kennlinie der Mikroelektroden außerdem asymmetrisch, d.h. es spielt eine Rolle, welcher Pol als Anode und welcher als Kathode geschaltet wird. Die Differenz zwischen beiden Modi könnte durch diffusionsbegrenzte Prozesse und Adsorption verursacht werden.

### 4.2.2 Analyse des Eingangssignals

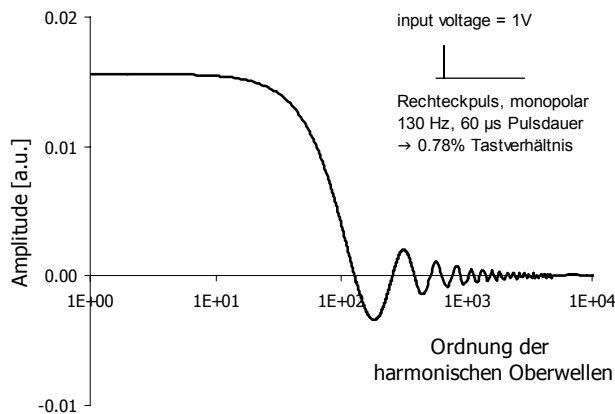


Abb. 4-13 Amplitudenspektrum des für die tiefe Hirnstimulation verwendeten Rechteckpulses nach Fouriertransformation.

Die Fourieranalyse des therapeutisch verwendeten Stimulationssignals von 130 Hz, die monopolar und mit einer Pulsweite von nur 60  $\mu$ s appliziert werden, zeigt, dass fast 5000 Harmonische notwendig sind, um solche kurzen Pulse zusammenzusetzen. Das sind etwa 50mal mehr als für das in Zellkulturen verwendete Tastverhältnis benötigt wurden. Man muss also zur Beschreibung des Elektrodensignals das Impedanzverhalten in einem umso größeren Frequenzbereich berücksichtigen, je kleiner das verwendete Tastverhältnis ist.

### 4.2.3 Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Mikroelektroden

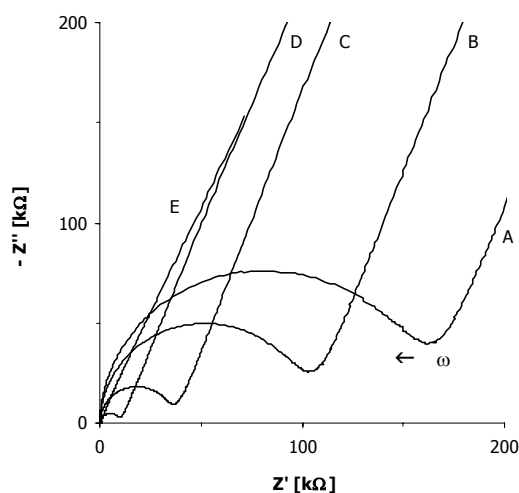


Abb. 4-14 Nyquistplot typischer Impedanzspektren in Abhängigkeit von der Elektrolytleitfähigkeit (Pt/Ir Elektrode,  $\varnothing$  75  $\mu$ m; A: 115.8  $\mu$ S/cm, B: 185.7  $\mu$ S/cm, C: 510  $\mu$ S/cm, D: 1.856 mS/cm, E: 32.9 mS/cm NaCl-Lösung)

Abb. 4-14 zeigt typische Impedanzspektren der untersuchten Mikroelektroden. Im Vergleich zu den platinisierten Platinelektroden (Abb. 4-5) fällt jedoch ein wesentlicher Unterschied ins Auge. Während die Impedanz der letzteren in NaCl-Lösung ausschließlich von der halbkreisförmigen Impedanz des Elektrolyts dominiert wird, ist die Impedanz der Mikroelektroden im unteren Frequenzbereich deutlich diffusionsabhängig. Das äußert sich in dem geraden Abschnitt des Spektrums. In physiologischer Lösung und in Zellkulturmedium ist das Verhalten der Elektrode ähnlich.

Die Spektren wurden an den bereits vorgestellten Ersatzschaltkreis angepasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-6, Abb. 4-7 und Tab. 4-1 enthalten. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Messreihen, die jeweils 5 Messwiederholungen an 3 verschiedenen Elektroden einer Geometrie beinhalteten.

Außer von der Leitfähigkeit und Elektrodengeometrie ist die Impedanz auch von der Stromdichte abhängig. In Abb. 4-15 sind beispielhaft einige Spektren als Bodeplot gezeigt. Das kapazitive Verhalten wird durch den negativen Phasenwinkel angezeigt.

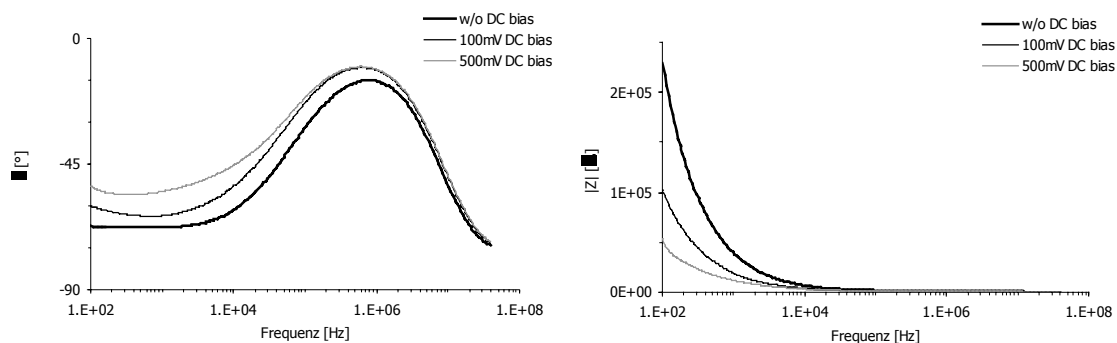


Abb. 4-15 Phasenwinkel und Betrag der Impedanz (Bodeplot) von Mikroelektroden (Pt/Ir-Elektrode,  $\varnothing$  75  $\mu$ m) gemessen mit verschiedenen Offsetspannungen (DC Bias).

Mit einer überlagerten Offsetspannung (DC Bias) und dadurch höherer Stromdichte werden abweichende Spektren gemessen. Die Veränderungen sind dabei von der Offsetamplitude abhängig. Mit zunehmender Stromdichte nimmt sowohl der Betrag als auch der Phasenwinkel der Impedanz ab. Das deutet auf ein weniger kapazitives Verhalten und einen effektiveren Ladungstransfer durch die Grenzfläche hin. Mikroelektroden können jedoch, anders als platinisierte Platinelektroden nicht als rein ohmscher Widerstand aufgefasst werden.

#### 4.2.4 Modellierung der räumlichen Feldverteilung

Die wichtigste Frage bei der elektrischen Stimulation von Gewebe ist die räumliche Verteilung des elektrischen Felds. Ist es homogen verteilt? Über welche Distanz wird das Gewebe beeinflusst? Um diese Fragen zu klären, benutzten wir die finite Integrationstechnik zur Berechnung der Verteilung des elektrischen Felds (Abb. 4-16). Das umgebende Medium, das das Gewebe repräsentieren soll, wurde als homogen und isotrop angenommen.

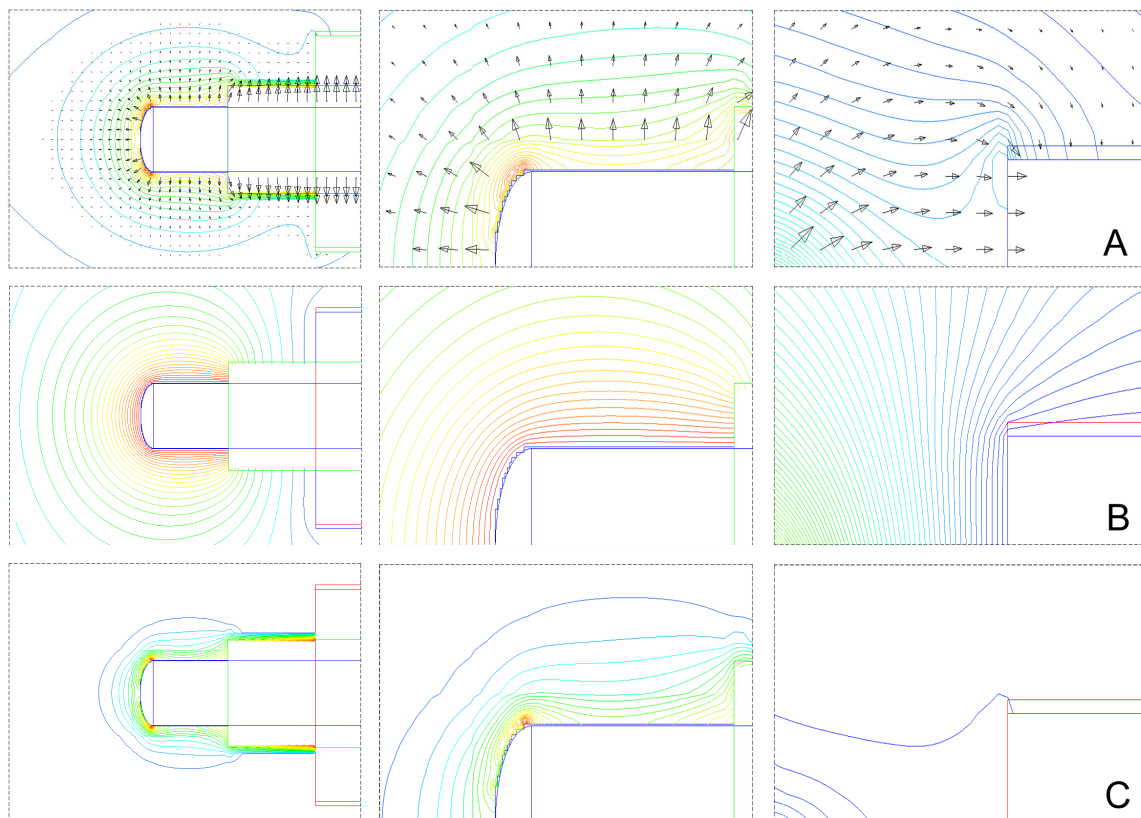


Abb. 4-16 Vektorplot und Isolinien von elektrischer Feldstärke (Reihe A), elektrischem Potential (Reihe B) und Stromdichte (Reihe C) berechnet für die Elektrodengeometrie S75.

Die koaxiale Elektrodengeometrie verursacht eine inhomogene räumliche Verteilung von elektrischem Feld, Potential und Stromdichte (Abb. 4-16A, B, C). Der Grad dieser Inhomogenität ist jedoch u.a. abhängig von der Geometrie der Elektrodenspitze und der Entfernung zwischen beiden Polen. Prinzipiell erhält man inhomogene Feldverteilungen mit lokalen Maxima an den Orten, wo sich der Krümmungsradius ändert wie der Elektrodenspitze und an der Grenzfläche Elektrode-Isolation. Man findet aber auch durchweg hohe Werte in unmittelbarer Nähe der Isolierung, was für einen starken Verschleiß in dieser Region spricht. Die elektrische Feldstärke innerhalb der Isolierung ist jedoch noch viel größer als im Elektrolyten und wurde daher in allen Darstellungen ausgeblendet. Mit zunehmender Entfernung von der differentiellen Elektrode nimmt die Feldstärke ab, so dass je nach Geometrie und appliziertem Potential eine maximale Reichweite für die Stimulation vorgegeben ist. Da viele verschieden geformte Elektroden kommerziell erhältlich sind und die Entscheidung welche Elektrode für einen bestimmten Zweck geeignet ist, schwer zu fällen ist, wurde der Einfluss der Elektrodengeometrie auf die Feldverteilung im Gewebe untersucht. Abhängig von der Form der Elektrodenspitze fanden wir einen sehr starken Einfluss auf die Reichweite und die Stärke des elektrischen Felds (Abb. 4-18).

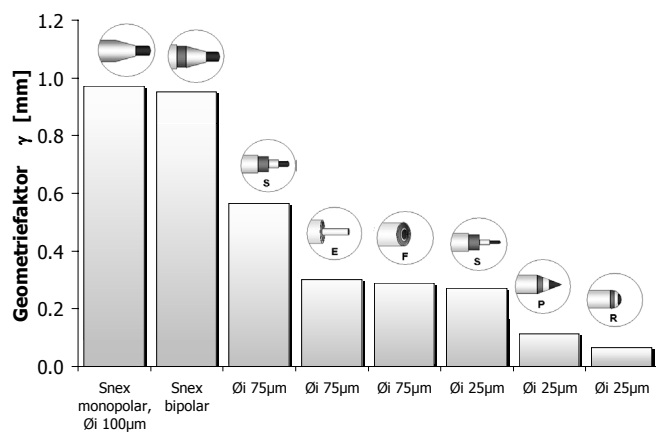


Abb. 4-17 Zusammenhang zwischen Geometriefaktor und Elektrodenparametern.

Tab. 4-3 Einzelwerte für Geometriefaktor und Elektrodenparameter.

Innendurchmesser	Typ	R in [kΩ]	γ in [mm]
Øi 100 µm, monopolar		0.686	0.972
Øi 100 µm, bipolar		0.700	0.952
Øi 75 µm	S	1.181	0.565
Øi 75 µm	E	2.210	0.302
Øi 75 µm	F	2.304	0.289
Øi 25 µm	S	2.463	0.271
Øi 25 µm	P	5.844	0.114
Øi 25 µm	R	10.310	0.065

Gleichung 9

Diese verschiedenen Eigenschaften sollen durch die Einführung eines Geometriefaktors  $\gamma$  beschrieben werden. Dieser Parameter wurde numerisch als differentielle Elektrodenimpedanz berechnet, indem das Vektorfeld der Stromdichte über einer geschlossenen Oberfläche integriert wurde. Dadurch erhält man den Gesamtstrom im System. Mit gegebenem Elektrodenpotential  $U$  erhält man für die Impedanz  $Z=U/I$ . Diese ist außerdem durch  $1/Z=\sigma A/d$  mit der Geometrie verknüpft. Indem man  $\gamma$  als  $\gamma=A/d$  definiert, erhält man

$$\frac{U}{I} = \frac{1}{\sigma \gamma}.$$

Auf diese Art und Weise verbindet der Geometriefaktor Strom und Spannung, unabhängig von der Elektrolytleitfähigkeit (Abb. 4-17, Tab. 4-3). Definiert man die Oberfläche, über die der Vektor summiert wird, in engem Kontakt zum Innenpol der Elektrode, erhält man Werte, die sehr gut mit theoretischen Werten übereinstimmen.

Das konnte durch die resultierende Leitfähigkeit leicht überprüft werden.

Angenommen, das System ist linear, kann man mit Gleichung 9 das Verhältnis von Strom und Spannung berechnen und das Elektrodenpotential so anpassen, das ein Gesamtstrom von 500 µA resultiert. Danach wurde das Elektrodenproblem neu berechnet. Abb. 4-18 illustriert die Stromnormierten Feldverteilungen, die sich um verschieden geformte Elektroden Spitzen ergeben.

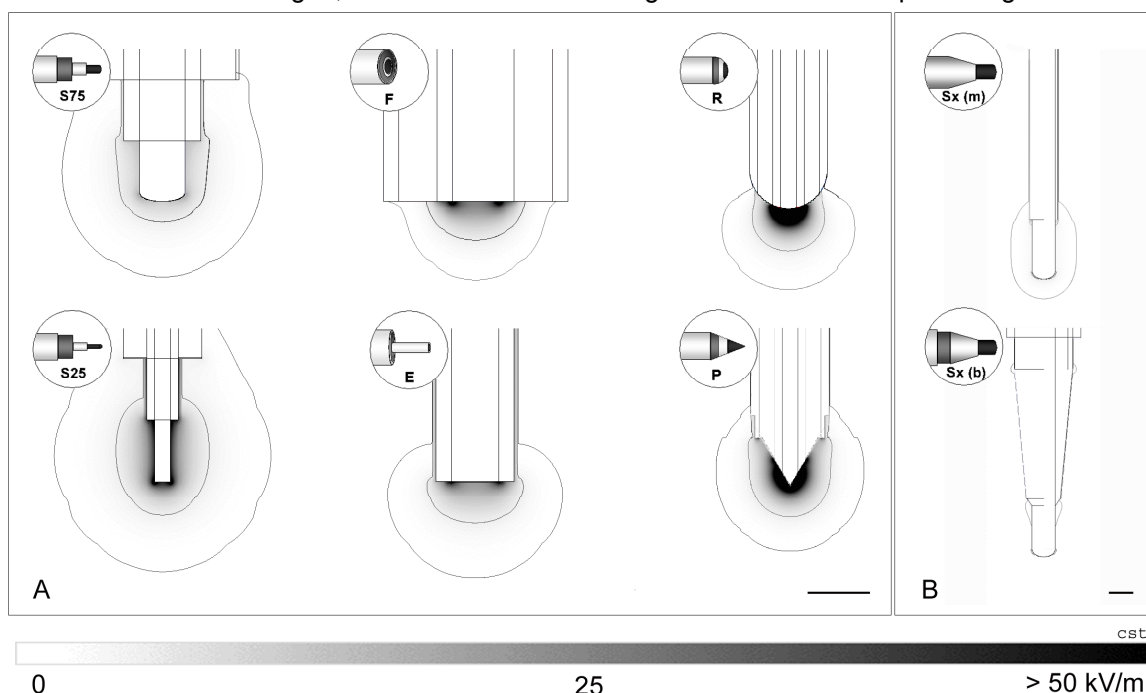


Abb. 4-18 Räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärke in der Nähe von Elektroden verschiedener Geometrie. Die Linien entsprechen dem Bereich von 1 kV/m bzw. 5 kV/m im Medium (A und B haben verschiedene Maßstäbe, Balken 100 µm).

Betrachtet man die lokalen Werte, wird klar, dass es in Bezug auf maximale Feldstärke, Feldgradienten und Reichweite große Unterschiede gibt. D.h. der Experimentator muss die Elektrode entsprechend der Größe des zu stimulierenden Gehirnbereichs auswählen. Als repräsentative Schwellen sind die Bereiche von 1 kV/m und 5 kV/m im Medium in Abb. 4-18 angegeben. Unter der Annahme, dass das Membranpotential vereinfacht durch Gleichung 2 berechnet werden kann, entsprechen die angegebenen Schwellen induzierten Membranpotentialveränderungen von 15 mV bzw. 75 mV.

#### 4.2.5 Alterung und Korrosion von Elektroden

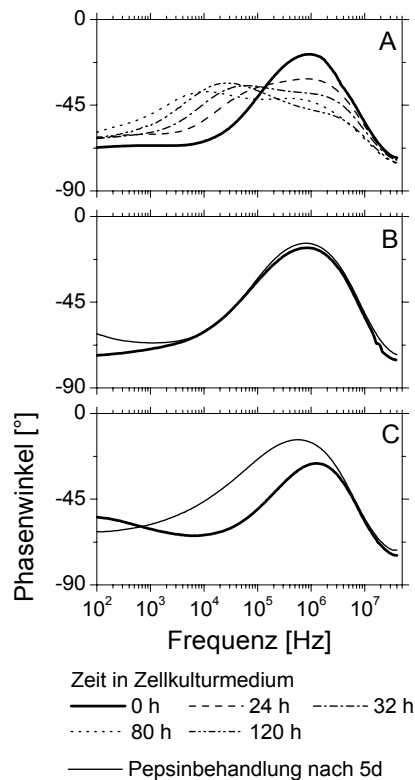


Abb. 4-19 Phasenwinkel der Impedanz in Abhängigkeit von der Eintauchzeit der Elektrode in Elektrolyt (A, B: Pt/Ir-Elektrode, C: Edelstahlelektrode). Erklärungen siehe Text.

Werden elektrische Felder über Elektroden im Elektrolyt erzeugt, können durch den Stromfluss verschiedene Elektrodenprozesse stattfinden. Dazu gehören z.B. die Bildung von Wasserstoff, Sauerstoff und Chlor, Redoxreaktionen der organischen Komponenten sowie die Auflösung des Elektrodenmetalls. Diese elektrochemischen Reaktionen können die Eigenschaften der Elektrode verändern. Aus diesem Grund wurden die Veränderungen in der Grenzflächenimpedanz während der Eintauchzeit in Elektrolytlösung untersucht.

Die verwendeten Elektroden wurden vor der Inkubation für ca. 30 Minuten Impedanzmessungen unterzogen. Die nachfolgende Inkubation in Zellkulturmedium dauerte 5 Tage. Zur Illustration sind Impedanzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation in Abb. 4-19 dargestellt. Wir fanden, dass der Phasenwinkel der Impedanz der empfindlichste Parameter ist, um Änderungen in den Eigenschaften der Grenzfläche zu verfolgen. Während einer Langzeitinkubation der Elektrode in komplexen organischen Lösungen erfährt das Phasenwinkelspektrum eine deutliche Verschiebung (Abb. 4-19A). Die Änderungen weisen auf eine zusätzliche Kapazität im System hin, die insbesondere im unteren Frequenzbereich von Bedeutung ist.

Nach 5 Tagen Inkubation in Zellkulturmedium wurden die Elektroden extensiv mit destilliertem Wasser gewaschen. Das konnte jedoch die ursprünglichen Impedanzspektren nicht

wiederherstellen. Daher wurde die Elektrodenoberfläche durch die Behandlung mit dem eiweißspaltenden Enzym Pepsin gereinigt. Durch diese Prozedur konnten die Spektren von Pt/Ir-Elektroden fast vollständig wiederhergestellt werden (Abb. 4-19B), im Fall von Edelstahlelektroden war das jedoch nicht möglich (Abb. 4-19C). Der verbleibende Unterschied zwischen den Spektren muss daher durch irreversible Reaktion, vor allem durch die Auflösung des Elektrodenmetalls verursacht sein.

Die Ergebnisse der Kurvenanpassung an den Ersatzschaltkreis liefern weitere Details zu den Prozessen, die an der Elektrodenoberfläche ablaufen. Die Leitfähigkeit in der Grenzfläche nimmt stetig ab und erreicht nach ca. 60 Stunden ein Plateau. Wenn dieses Plateau erreicht ist, gibt es kaum noch Unterschiede zwischen verschiedenen Elektrodenmaterialien. Das deutet darauf hin, dass die Schicht organischer Moleküle, die sich an der Elektrodenoberfläche gebildet hat, diese bereits komplett bedeckt und vor weiterer Korrosion schützt. Gleichzeitig sinkt der fraktale Exponent des CPE, was eine rauere bzw. ungleichmäßig bedeckte Oberfläche impliziert.



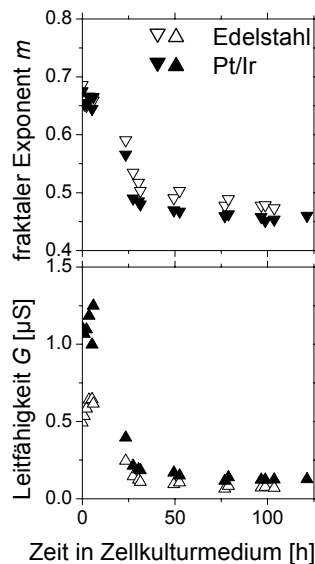


Abb. 4-20 Gefittete Werte für den fraktalen Exponenten und die Leitfähigkeit des CPE von verschiedenen Mikroelektroden ( $\varnothing$  75  $\mu m$ ) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Zellkulturmedium.

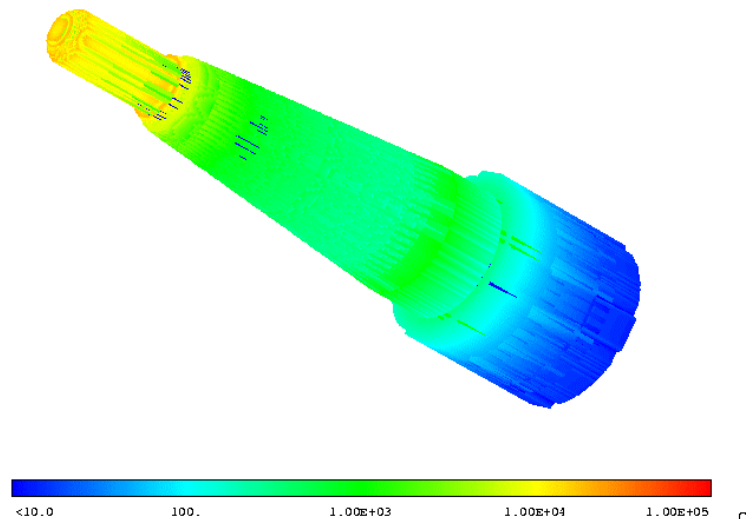


Abb. 4-21 Räumliche Verteilung der Stromdichte direkt auf der Elektrodenoberfläche als Ergebnis der numerischen Modellierung (FIT).

Abb. 4-21 illustriert die lokale Verteilung der Stromdichte direkt auf der Elektrodenoberfläche. Da die Stromdichte die Geschwindigkeit der elektrochemischen Reaktionen repräsentiert, ist sie eng mit der Korrosion verbunden. An Orten hoher Stromdichte sind demzufolge verstärkte Korrosionsprozesse zu erwarten. Daher sind besonders die Elektrodenspitze und die Grenzfläche Elektrode-Isolation von Interesse. Vergleicht man die Ergebnisse der numerischen Simulation mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, die von einer neuen und einer etwa 8 Stunden genutzten Elektrode gemacht wurden, findet man eine gute Übereinstimmung von berechneten Stromdichtemaxima und Materialverschleiß (Abb. 4-22).

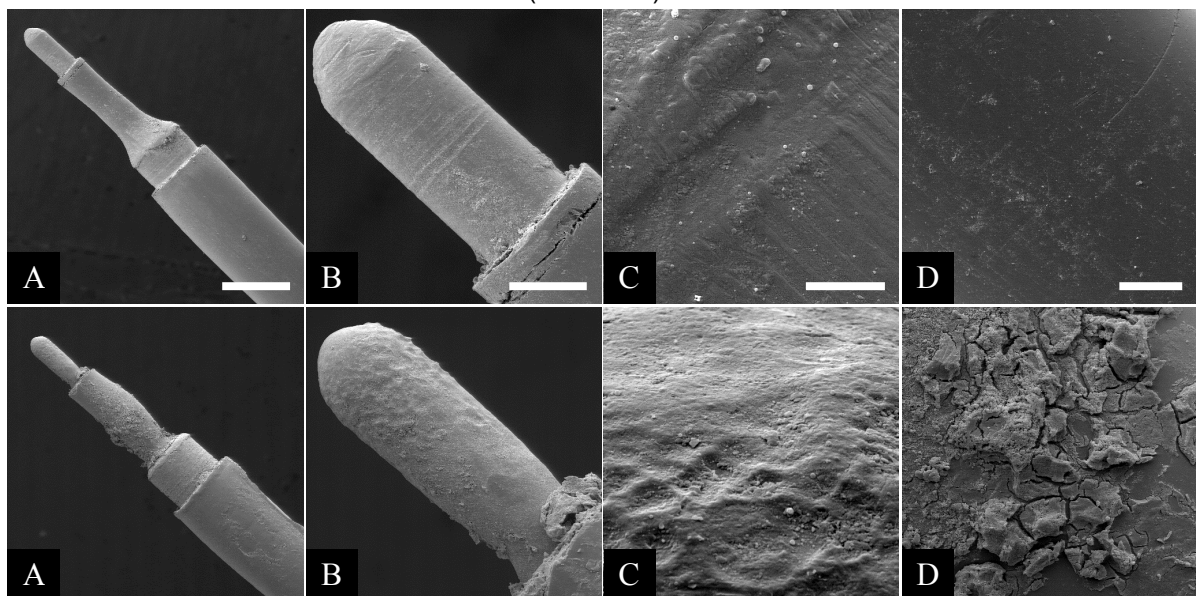


Abb. 4-22 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer neuen (obere Reihe) und gebrauchten (untere Reihe) Edelstahl-Mikroelektrode ( $\varnothing$  100  $\mu m$ ). Die korrodierte Elektrode befand sich zuvor ca. 8h in ununterbrochener Benutzung. (A: Übersicht, Balken 300  $\mu m$ , B: Elektrodenspitze, Balken 70  $\mu m$ , C: metallische Oberfläche der Spitze, Balken, 5  $\mu m$ , D: Oberfläche der Epoxy-Isolation, Balken, 20  $\mu m$ )

## 5 Zellbiologische Ergebnisse – Wirkung elektrischer Felder auf zelluläre Parameter von Knochenzellen

### 5.1 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration

#### 5.1.1 Beeinflussung der Messung durch die UV-Empfindlichkeit der Zellen

##### 5.1.1.1 UV-Empfindlichkeit von Osteosarcoma- Zellen

In Vorversuchen musste festgestellt werden, dass bereits unbefeldete HOS TE85 einen Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration zeigten. Diese Reaktion war abhängig vom Messtakt und damit von der während der Messung applizierten Dosis des Fluoreszenzanregungslichts. Da die Anregungswellenlängen für den Kalzium-sensitiven Farbstoff Fura-2 im ultravioletten Bereich des Spektrums liegen (334 nm und 380 nm), sind die Zellen während eines 30minütigen Experiments einer nicht zu unterschätzenden UVA-Strahlungsdosis ausgesetzt.

Die morphologischen Veränderungen, die HOS TE85 während längerer UVA-Belichtung erfahren, zeigt Abb. 5-1. Im Laufe des Experiments kugeln sich die bestrahlten Zellen zunehmend ab, teilweise werden auch Vesikel abgeschnürt.

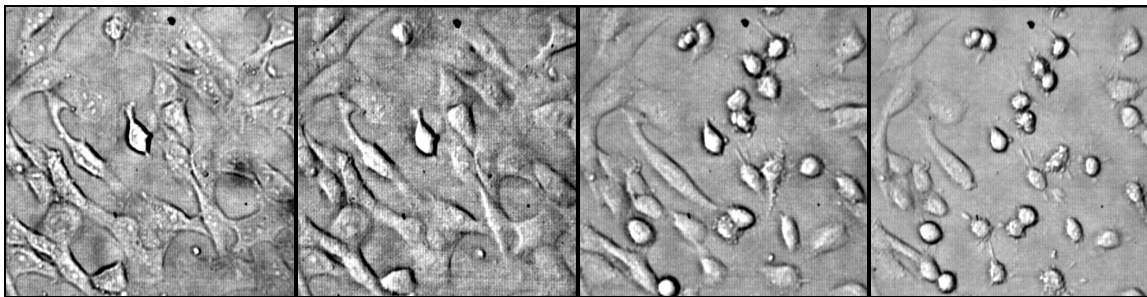


Abb. 5-1 Mikroskopische Durchlichtbilder von HOS TE85 während längerer Belichtung mit 334/380 nm.

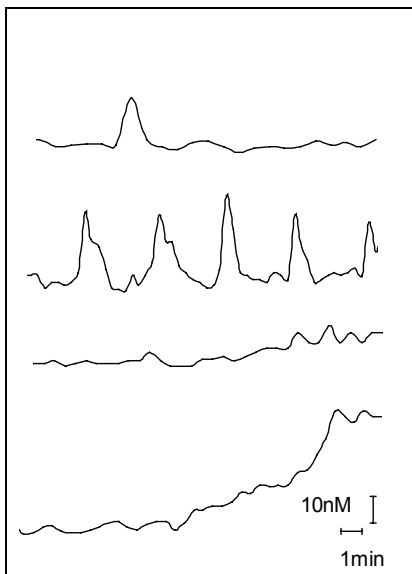


Abb. 5-2 Exemplarisches Verhalten der intrazellulären Kalziumkonzentration während der Versuchszeit. Man findet Peaks, Oszillationen, langsame und schnelle Anstiege mit anschließend erhöhter Kalziumkonzentration (von oben nach unten).

Deshalb wurde die Strahlungsleistung des ultravioletten Fluoreszenzanregungslichts vor und nach jedem Experiment gemessen und deren Mittelwert der Dosisberechnung zugrunde gelegt (siehe Kap. 3.1.2.2). Diese berücksichtigt die Dauer eines einzelnen Anregungsblitzes und den verwendeten Messtakt.

Die maximale Dosisleistung während der Experimente betrug  $844 \text{ W/m}^2$  für 334 nm und  $2768 \text{ W/m}^2$  für 380 nm. Bei schnellstmöglichem Messtakt entsprechen diese Werte einer maximalen Dosis von  $317 \text{ kJ/m}^2$  für 334 nm und  $1038 \text{ kJ/m}^2$  für 380 nm. Demzufolge betrug die gesamte Dosis  $1355 \text{ kJ/m}^2$ . Das ist der Maximalwert, der jedoch nur für die Zellen in der Mitte des mikroskopischen Gesichtsfeldes gilt, Zellen am Rand des Gesichtsfeldes waren einer geringeren Dosis ausgesetzt.

Die Variation der Dosis erfolgte in erster Linie durch die Veränderung des Messtakts. Unabhängig davon sinkt die Strahlungsleistung und Strahlungsdosis mit zunehmendem Alter der Lampe. Während der Zeit, in der diese Experimente durchgeführt wurden, sank die Dosisleistung von  $1115 \text{ W/m}^2$  auf  $225 \text{ W/m}^2$ . Um diesen altersbedingten Prozess zu kompensieren, musste der Messtakt verkürzt

werden. Das bedeutete aber sowohl eine Veränderung der Strahlungsdosis als auch der Strahlungsleistung. Beide Parameter können aus diesem Grund nicht unabhängig voneinander verändert werden.

Als Reaktion auf die applizierte UVA-Dosis beobachteten wir ein sehr heterogenes Verhalten der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das beinhaltete sowohl transiente Veränderungen (Peaks) als auch anhaltende Anstiege und Oszillationen (Abb. 5-2). Die Auswertung erfolgte daher durch Einteilung aller Zellen eines Versuches in zwei Klassen: reagierend und nicht reagierend. Als reagierend wurden solche Zellen bewertet, die entweder einen transienten oder dauerhaften Anstieg der internen Kalziumkonzentration zeigen. Die prozentualen Anteile dieser beiden Klassen korrelieren vor allem mit der Strahlungsdosis, weniger mit der Strahlungsdosisleistung (Abb. 5-3, Abb. 5-4). Es war experimentell jedoch nicht möglich, beide Parameter unabhängig voneinander zu verändern.

Die Regression der Daten erfolgte mit einem vereinfachten sigmoiden Modell:

$$f(x) = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{x_{50}}\right)^{-p}}$$

Gleichung 10

Damit erhält man für die Halbwertsdosis  $x_{50}$  ( $48 \pm 7$ ) kJ/m<sup>2</sup> und  $1.2 \pm 0.3$  für den Exponenten  $p$ . Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.55 und bestätigt die Dosisabhängigkeit für den beobachteten Effekt.

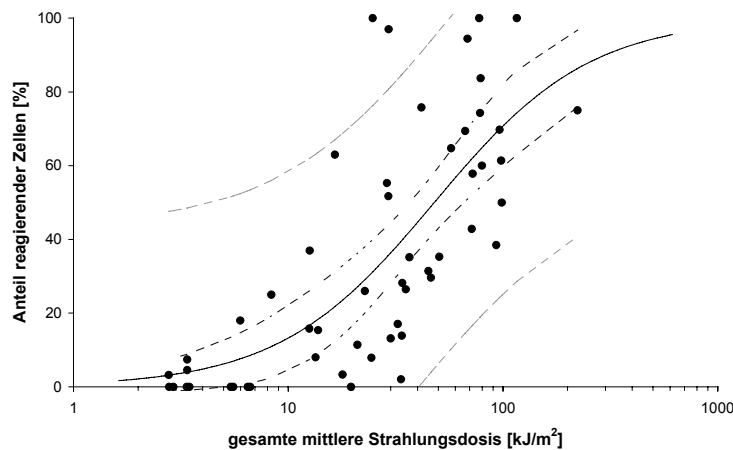


Abb. 5-3 Prozentualer Anteil der reagierenden HOS TE85-Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der gesamten mittleren Strahlungsdosis während eines Versuches. Die durchgezogene Linie zeigt die sigmoide Kurvenanpassung mit dem dazugehörigen 95%-Vertrauensbereich (gestrichelte Linie, schwarz) und den 95%-Bereich der Gesamtpopulation (gestrichelte Linie, grau).

#### 5.1.1.2 UV-Empfindlichkeit von Osteoblasten

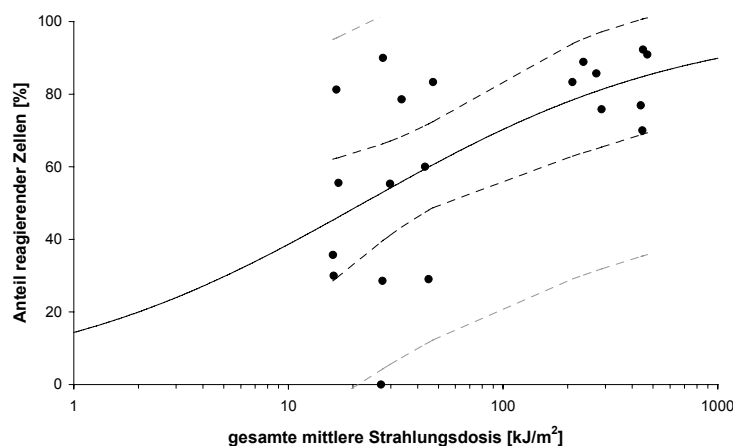


Abb. 5-4 Prozentualer Anteil der reagierenden primären OB an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der gesamten mittleren Strahlungsdosis während eines Versuches. Die durchgezogene Linie zeigt die sigmoide Kurvenanpassung mit dem dazugehörigen 95%-Vertrauensbereich (gestrichelte Linie, schwarz) und den 95%-Bereich der Gesamtpopulation (gestrichelte Linie, grau).

Für primäre Osteoblasten konnte eine ähnliche Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration von der UVA-Dosis gefunden werden. Wir bereits bei Osteosarcomazellen beobachtet wurde, bewirken hohe Strahlungsdosen in nahezu allen Zellen eine Erhöhung der Kalziumkonzentration. In den durchgeführten Experimenten konnte die Dosis jedoch nicht soweit verringert werden, dass keine Veränderung des zellulären Kalziumspiegels mehr erfolgte. Das weist darauf hin, dass primäre Zellen empfindlicher gegenüber UVA-Strahlung sind. Das wird auch durch die Ergebnisse der Regression

bestätigt. Da der Kurvenanpassung jedoch nur relativ wenige Experimente zugrunde gelegt werden konnten, sind die ermittelten Parameter mit einem großen Fehler behaftet. Man erhält für die Halbwertsdosis  $x_{50}$  ( $22 \pm 10$ ) kJ/m<sup>2</sup> und  $0.6 \pm 0.2$  für den Exponenten  $p$ . Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0.34.

### 5.1.1.3 Abhängigkeit der UV-Empfindlichkeit vom individuellen Zustand der Zellen

Der Hypothese folgend, dass nur ausgewählte zelluläre Stadien sensibel auf bestimmte äußere Reize sind, wurden HOS TE85 mittels Aphidicolin synchronisiert. Aphidicolin ist ein Inhibitor der DNA-Polymerase und bewirkt eine Akkumulation der Zellen am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase. Nach Entfernen des Inhibitors erfolgt der relativ synchrone Wiedereintritt in den Zyklus. Dadurch nimmt der Anteil der S-Phasen von 30% (normal) auf maximal 85% (synchronisiert) zu. Im Anschluss wurde die Reaktion der Zellen auf UVA-Belichtung in verschiedenen Stadien des Zellzyklus untersucht. Die verwendete Dosis von 60 kJ/m<sup>2</sup> entspricht in etwa der für unsynchronisierte Zellen ermittelten Halbwertsdosis [183]. Abb. 5-5 zeigt den zeitlichen Verlauf der UVA-Wirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von HOS TE85. Außerdem enthält die Abbildung die prozentualen Anteile von G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phasen an der Gesamtpopulation. Direkt am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase beobachtet man eine sehr starke UVA-Wirkung, die aber mit dem Wiedereintritt in den Zellzyklus sehr schnell nachlässt und während des folgenden Beobachtungszeitraums auf einem mittleren Niveau verbleibt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die UV-Empfindlichkeit von HOS TE85 während der S-Phase nicht erhöht ist. Vielmehr scheinen die späte G<sub>1</sub>-Phase, insbesondere der G<sub>1</sub>/S-Übergang, sowie die G<sub>2</sub>-Phase strahlungsempfindliche Punkte innerhalb des Zellzyklus zu sein. Aufgrund des hohen Anteils an G<sub>1</sub>-Phasen (>50%) in unsynchronisierten Populationen führt diese Tatsache zu einem relativ hohen „Grundrauschen“ durch UV-bedingte Zellreaktionen.

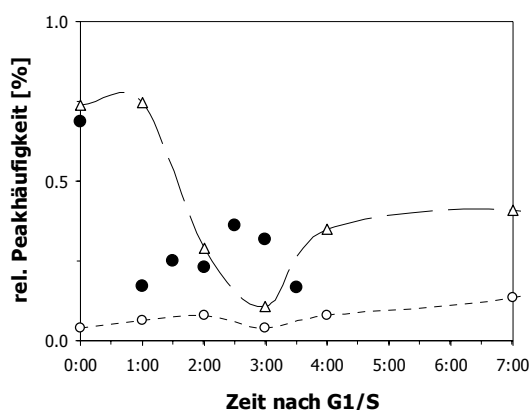


Abb. 5-5 Zeitlicher Verlauf der Stimulierbarkeit von synchronisierten HOS TE85 durch UVA (● 60 kJ/m<sup>2</sup>), relativer Anteil an G<sub>2</sub>- (○) und synchronisierten HOS TE85 am G<sub>1</sub>/S-Übergang (● 0:00h) und nach G<sub>1</sub>-Phasen (Δ).

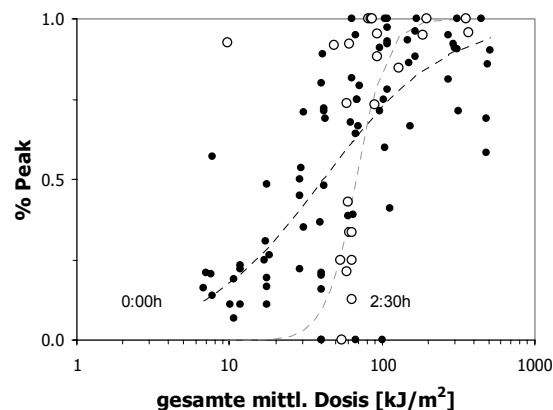


Abb. 5-6 UV-Dosisabhängigkeit der Zellreaktion von synchronisierten HOS TE85 am G<sub>1</sub>/S-Übergang (● 0:00h) und nach Wiedereintritt in den Zellzyklus (○ 2:30h, S-Phase).

Im Anschluß wurde für festgelegte Punkte des Zellzyklus die Dosisabhängigkeit bestimmt (Abb. 5-6). Als Zeitpunkte wurden der G<sub>1</sub>/S-Übergang und die frühe S-Phase, 2:30h nach dem Wiedereintritt in den Zellzyklus ausgewählt. Bei ersterem wurde eine sehr starke UV-Wirkung beobachtet (Abb. 5-5), am zweiten Punkt trat die maximale Feldwirkung auf (Kap. 5.1.4). Die sigmoide Kurvenanpassung lieferte folgende Parameter:

	$x_{50}$	$p$	$r^2$
Zeit 0:00h	$41 \pm 5$	$1.1 \pm 0.2$	0.54
Zeit 2:30h	$68 \pm 10$	$4.4 \pm 3.4$	0.49

Das zeigt, dass sich nicht nur die Halbwertsdosis verändert, sondern vor allem die Steigung der Kurve. Das bewirkt während der S-Phase eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber geringen Strahlungsdosen. Hohe Dosen führen aber zu einem starken Effekt, der mit den Beobachtungen an anderen Zellpopulationen vergleichbar ist. Das weist auf die Existenz einer maximal verträglichen UV-Dosis unabhängig vom Zellzyklus hin.

### 5.1.2 Wirkung niederfrequenter gepulster elektrischer Felder auf Osteosarcomazellen

Der Einfluss niederfrequent gepulster elektrischer Gleichfelder auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von HOS-Zellen wurde während der direkten Applikation einer Rechteckspannung konstanter Pulslänge (entsprechend 1.5 Hz) und variabler Amplitude untersucht. Zur Feldapplikation in den Zellkulturen wurden die im Vorfeld untersuchten Elektroden verwendet (Kap. 3.2.2.1 und 4.1). Mit den verwendeten Elektrodenanordnungen konnte ein Feldstärkenbereich von 10 V/m bis 3 kV/m abgedeckt werden.

Die Untersuchungen der intrazellulären Kalziumkonzentration unter dem Einfluss elektrischer Felder zeigen einen prinzipiellen Unterschied zu anderen, rezeptorvermittelten Zellprozessen wie z.B. der Wirkung von PTH. In jenem Fall wird durch die spezifische Bindung des Agonisten an den Rezeptor eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die einen eindeutigen und dosisabhängigen zellulären Effekt vermittelt. Kalzium trägt als Bestandteil dieser Signalkaskade vorrangig durch schnelle, transiente Veränderungen seiner freien zytoplasmatischen Konzentration zur Weiterleitung externer Stimuli bei. Bei den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden jedoch sehr heterogene Reaktionen der internen Kalziumkonzentration beobachtet, die sowohl transiente als auch dauerhafte Veränderungen sowie Oszillationen umfassten (Abb. 5-2 und Abb. 5-14). Dieses Verhalten ähnelt den bereits beschriebenen UVA- bedingten Zellreaktionen und könnte ein Hinweis darauf sein, dass keiner der beiden Effekte durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird. Dabei ist nicht eindeutig klar, welche der beobachteten Zellreaktionen für die Vermittlung eines dauerhaften Feldeffekts relevant ist. Diese Heterogenität in den Zellreaktionen stellte uns vor das Problem, eine sinnvolle Auswertemethode zu finden.

Relativ leicht zugänglich und robust gegen Ausreißer und Streuungen erwiesen sich Intervall-Medianwerte, die zellindividuell ermittelt und in Verteilungskurven zusammengefasst werden (Abb. 5-7). Wie bereits erwähnt, waren die Messwerte in fast allen Fällen linkssteil und damit nicht normalverteilt. Aufgrund dieser Asymmetrie durften keine parametrischen statistischen Verfahren wie z.B. der t-Test angewandt werden.

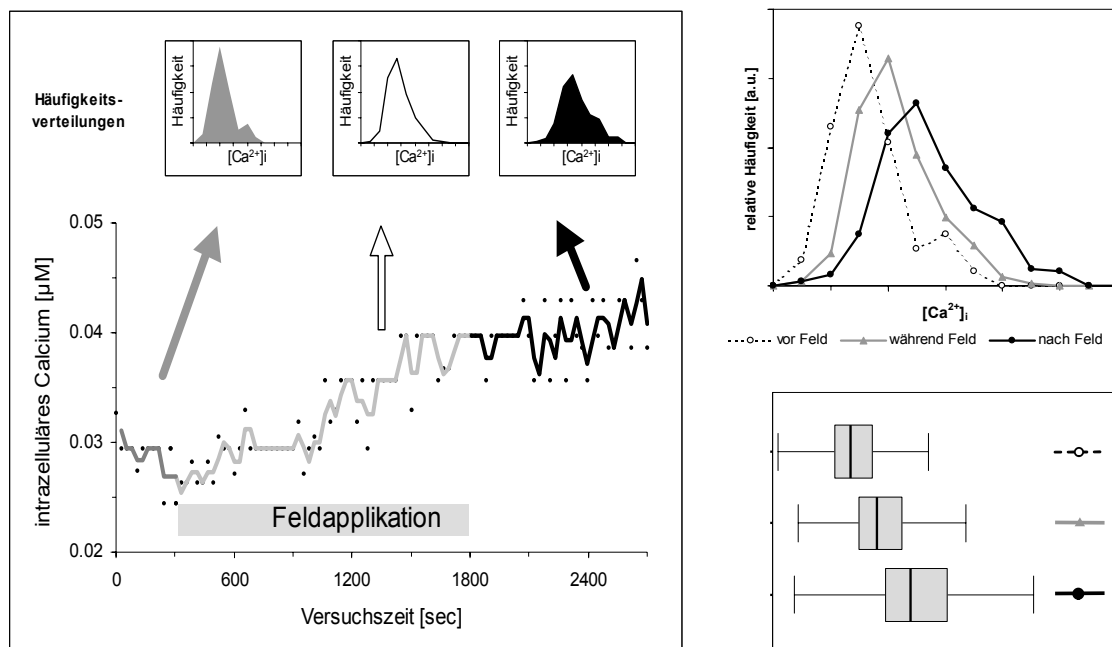


Abb. 5-7 Auswertung der Kalziumkinetik von Einzelzellen. Links: Die Mediane der Zeitintervalle vor, während und nach Feldapplikation werden bestimmt; alle Einzelwerte liefern die oben gezeigten Histogramme. Rechts: Vergleich der Verteilungsform über Histogrammdarstellungen (oben) und Boxplots (unten). Der Boxplot ist ein Diagramm auf der Grundlage des Medians, der Quartile und der Extremwerte. Die Box stellt den Interquartilbereich (25-75%) mit 50% der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien führen jeweils bis zum höchsten und niedrigsten Wert, ohne Ausreißer zu berücksichtigen. Die quer über die Box gelegte Linie gibt die Lage des Medians wieder.

Um festzustellen, ob sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration während des Versuchs überhaupt verändert, wurde ein „innerer Vergleich“ durchgeführt. Dabei werden die Medianwertverteilungen

verschiedener Intervalle ein und desselben Versuchs miteinander verglichen (z.B. vor Feld/nach Feld). Dieser mit dem Wilcoxon-Test durchgeführte innere Vergleich bestätigt, dass sich die intervallspezifischen Kalzium-Medianwerte jeder Versuchsgruppe voneinander unterscheiden. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Verteilungen kann aber sowohl UV- als auch Feld-bedingt sein. Es ist sogar anzunehmen, dass sich beide Effekte überlagern. Deshalb wurden anschließend Vergleiche für Medianwertverteilungen ein und desselben Intervalls verschiedener Versuche durchgeführt. Um verlässliche Aussagen in der Befeldungs- bzw. in der Nachbeobachtungsphase zu erhalten, war es jedoch wichtig, dass es in der Vorlaufphase (ohne Feld) keine Unterschiede zwischen den Versuchen gibt. Solche Unterschiede können u.a. durch Zellzustand, Farbstoffkonzentration, Beleuchtungsintensität und Temperatur bedingt sein. Deshalb wurde der Intervall-Median jedes Versuchsabschnitts für jede einzelne Zelle auf den Anfangswert (Vorlauf) bezogen und die Verteilungen so normiert.

In allen Versuchsgruppen konnte bei der Mehrzahl der Zellen ein Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden. Darunter fallen auch transiente Veränderungen wie sie beispielsweise von Peaks oder Oszillationen hervorgerufen werden. Das Auftreten solcher Veränderungen war jedoch zeitlich nicht auf die Dauer der Feldapplikation begrenzt. Sehr oft konnte auch nach Abschalten des Feldes ein weiteres Ansteigen der Kalziumkonzentration beobachtet werden. In einigen Versuchen begann der Anstieg bereits mit dem Versuchsbeginn und kann daher nicht durch das Feld ausgelöst worden sein.

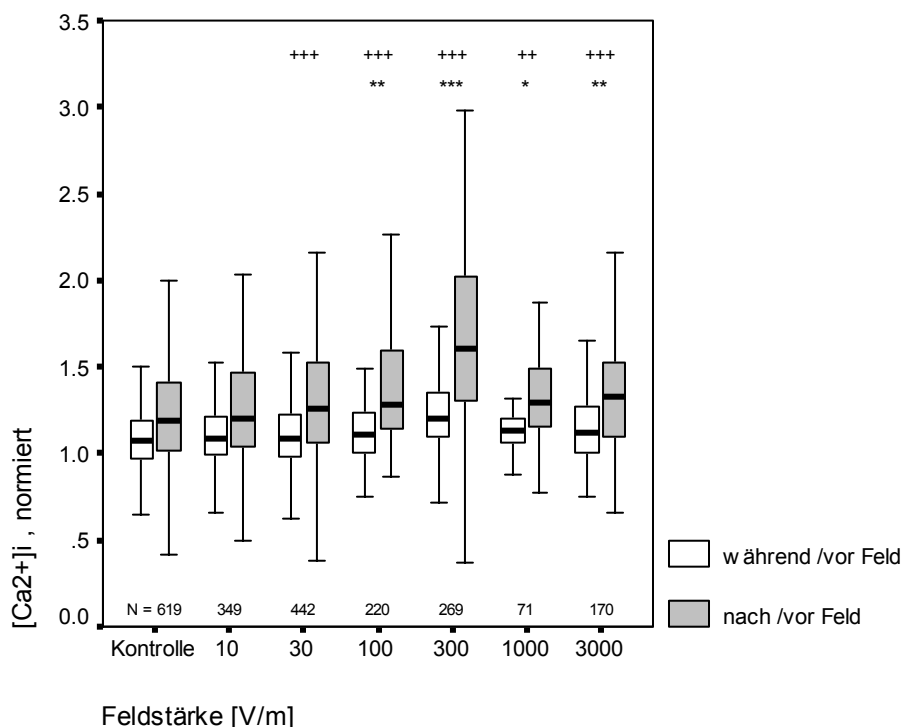


Abb. 5-8 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von HOS TE85 nach der Applikation von PEMF verschiedener Feldstärke. Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++;  $p < 0.01$  \*\*/++;  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

Betrachtet man die Verteilung der Kalzium-Medianwerte nach der PEMF-Applikation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5-8), lässt sich feststellen, dass sowohl in Kontroll- als auch in Feldexperimenten die mittlere Kalziumkonzentration zunimmt. Die Verteilungen sind jedoch nicht symmetrisch, sondern ausnahmslos linksschief. D.h. es gibt einen größeren Anteil an Zellen, die einen überdurchschnittlich hohen Kalziumgehalt haben. Bei Feldexperimenten nimmt die Spannweite der Verteilung sogar noch zu. Zum Teil wird die linke Flanke der Verteilung steiler als die entsprechende Kontrolle, d.h. dass sich weniger Zellen im unteren Konzentrationsbereich befinden. An der rechten Flanke bilden sich in einigen Gruppen Schultern, die ebenfalls auf eine Verschiebung zu höheren Konzentrationen hindeuten. Eventuell handelt es sich dabei sogar um eine bestimmte, sensiblere Subpopulation von Zellen. Die Erhöhung der mittleren Kalziumkonzentration und die Verbreiterung der Verteilung sind im

mittleren Feldstärkebereich von 30 V/m bis 300 V/m am stärksten ausgeprägt. Eine Veränderung der Verteilungsform ist jedoch nicht zwangsläufig mit einer deutlichen Verschiebung des Medians verbunden (Abb. 5-8, 30 V/m).

Die größten Konzentrationsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle treten in der Nachbeobachtungszeit auf. Diese Werte sind immer höher als die entsprechenden Konzentrationen während der Feldapplikation. Dieses Verhalten lässt auf überwiegend langsame, andauernde Anstiege der Kalziumkonzentration oder auf Peaks mit nachfolgend erhöhter Konzentration schließen. Im Ergebnis bleibt die zytosolische Kalziumkonzentration der Zellen längerfristig erhöht.

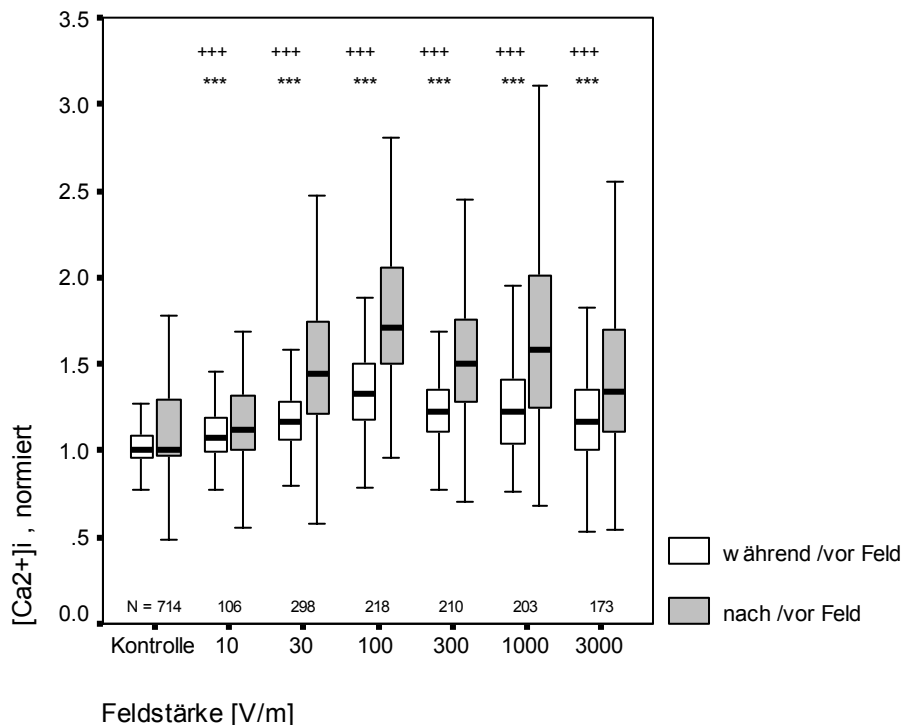


Abb. 5-9 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von HOS TE85 nach der Applikation von PEMF verschiedener Feldstärke und zusätzlichem oxidativen Stress. Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

In Abb. 5-9 sind Versuche dargestellt, die mit zusätzlichem oxidativen Stress durch die Zugabe von SIN-1 durchgeführt wurden. Qualitativ sind die Verteilungen der Kalzium-Medianwerte denen der normalen Versuche vergleichbar, jedoch treten bestimmte Verteilungsunterschiede stärker hervor (vgl. Abb. 5-8). Auch hier handelt es sich um linksschiefe Verteilungen, die sowohl für Kontroll- als auch für Feldexperimente einen Anstieg der mittleren Kalziumkonzentration aufzeigen. Der erhöhte Anteil von reaktiven Sauerstoffspezies in der Versuchslösung manifestiert sich auch in einer stärkeren Rechtsverschiebung, d.h. zu höheren Kalziumkonzentrationen, der Kontrollen. Den gleichen Effekt findet man auch in den befeldeten Gruppen, er ist jedoch wesentlich stärker ausgeprägt und tritt wiederum besonders im mittleren Feldstärkebereich auf.

Aber im Vergleich zu den normalen Versuchen, d.h. denen ohne erhöhtes Stressniveau, sind die Unterschiede zur Kontrolle deutlicher und die Verschiebungen der Verteilung treten in einem größeren Feldstärkebereich auf. Während in den normalen Versuchen nur der Feldstärkebereich von 30 V/m bis 300 V/m wirksam war, konnten bei gleichzeitiger Erhöhung des oxidativen Stress im gesamten Messbereich signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe gefunden werden. Diese Unterschiede manifestieren sich in einer echten Verschiebung des Medians.

Auch in dieser Versuchsserie sind die Unterschiede in der Kalziumkonzentration im Zeitraum nach der Befeldung am größten. Das spricht auch hier für eine andauernde Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Das lässt eine überwiegende Beteiligung von langsameren Influxprozessen vermuten.

Einen zusammenfassenden Vergleich der Versuche ohne/mit zusätzlichem oxidativen Stress bietet

Abb. 5-10. In beiden Fällen ist die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration gegenüber der Kontrolle im mittleren Feldstärkebereich am größten. Zusätzlicher oxidativer Stress verstärkt diesen Effekt noch. Besonders erfolgversprechend erscheint der Bereich von 100 V/m bis 1000 V/m. Außerdem muss man davon ausgehen, dass die gleichzeitige Erhöhung des oxidativen Stresses während der Experimente nicht nur zu einer einfachen Addition beider Effekte führt. Da die in Abb. 5-10 dargestellten Einzelwerte der normalen Versuche in Relation zur Kontrolle (-), die der zusätzlich gestressten Versuche jedoch in Relation zur entsprechend positiven Kontrolle (+) erhalten wurden, hätte eine bloße Addition beider Effekte keinen Unterschied zwischen den Versuchsreihen zur Folge gehabt. Man kann deshalb eine synergistische Wirkung von oxidativem Stress und gepulsten elektrischen Feldern vermuten.

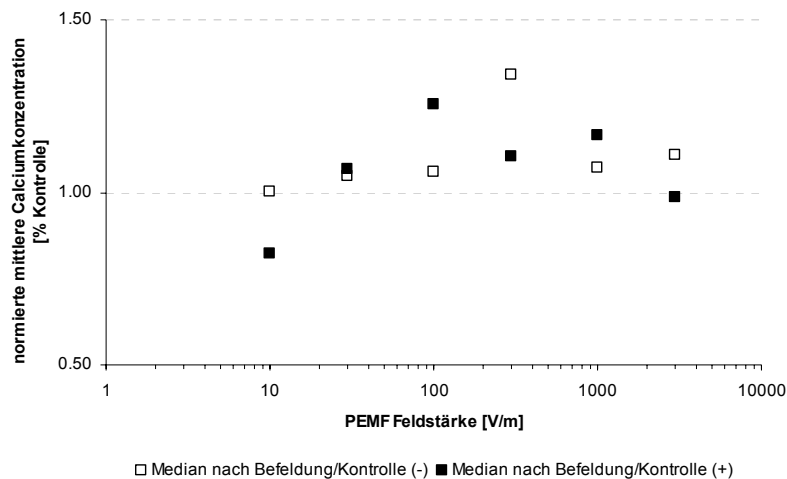


Abb. 5-10 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration von HOS TE85 ohne (-)/mit (+) zusätzlichem oxidativen Stress nach der Applikation von PEMF verschiedener Feldstärke in Relation zur Kontrolle. Aufgetragen sind die Mediane der Verteilungen aus Abb. 5-9 bzw. Abb. 5-8.

### 5.1.3 Wirkung niederfrequent modulierter, elektrischer Hochfrequenzfelder auf Osteosarcomazellen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss modulierter elektrischer Wechselfelder im Frequenzbereich von 100 Hz bis 100 kHz untersucht. Die angegebene Trägerfrequenz wurde stets mit 16 Hz und einer Tiefe von 100% amplitudenmoduliert. Um der Fragestellung nachzugehen, inwieweit die oxidative Wirkung des UVA-Anregungslichts und das applizierte elektrische Feld synergistisch wirken, wurden alle Versuche mit zwei unterschiedlichen Messtakten (10 sec und 30 sec) durchgeführt. Das entspricht einer durchschnittlichen UV-Dosis von 30 kJ/m<sup>2</sup> bzw. 15 kJ/m<sup>2</sup>.

Wie zu erwarten ist die Verteilung der Kalziummittelwerte nach der Applikation von amplitudenmodulierten Sinusfeldern ebenfalls linksschief (Abb. 5-11). Das gilt sowohl für Kontroll- als auch für Feldexperimente. Anders als in der Serie mit gepulsten Feldern treten aber in dieser Versuchsreihe nur geringe Veränderungen der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration auf. Prinzipiell muss aber berücksichtigt werden, dass die Gesamtdauer dieser Versuche durch die Befeldungsdauer 5 min kürzer war als die der Serie mit gepulsten Feldern. Die Absolutwerte der Kalziumkonzentration können daher nicht direkt miteinander verglichen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Länge der Versuchsintervalle während Befeldung und nach Befeldung verhalten sich die entsprechenden Konzentrationsveränderungen auch nicht proportional. Es fällt jedoch auf, dass in einigen Gruppen (300 Hz, 10 kHz, 30 kHz) besonders große Unterschiede zwischen den beiden Intervallmedianwerten auftreten, die für einen verzögerten Anstieg der Kalziumkonzentration oder einzelne Peaks in der Nachbeobachtungsphase sprechen. Auffallend kleine Unterschiede der Intervallmedianwerte (100 Hz, 3 kHz, 100 kHz) sind in erster Linie durch Änderungen in der Verteilungsform verursacht. Der Median der Kalziumkonzentrationen wird dabei nur geringfügig verschoben.

In Versuchen mit geringer UVA-Belastung treten während der Befeldung prinzipiell niedrigere mittlere Kalziumkonzentrationen auf als in den entsprechenden Kontrollen. Lediglich im Bereich von 300 Hz bis 1 kHz ist dieser verminderte Effekt weniger ausgeprägt. Im Nachbeobachtungszeitraum setzt



sich dieses Verhalten fort. Zusätzlich verschwindet der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der 30 kHz-Gruppe. Das bedeutet, dass in der Gruppe 30 kHz der dauerhafte Anstieg der Kalziumkonzentration v.a. nach Feldapplikation erfolgte. Eventuell während der Applikation auftretende Peaks haben nur einen geringen Einfluss auf den Intervallmedian.

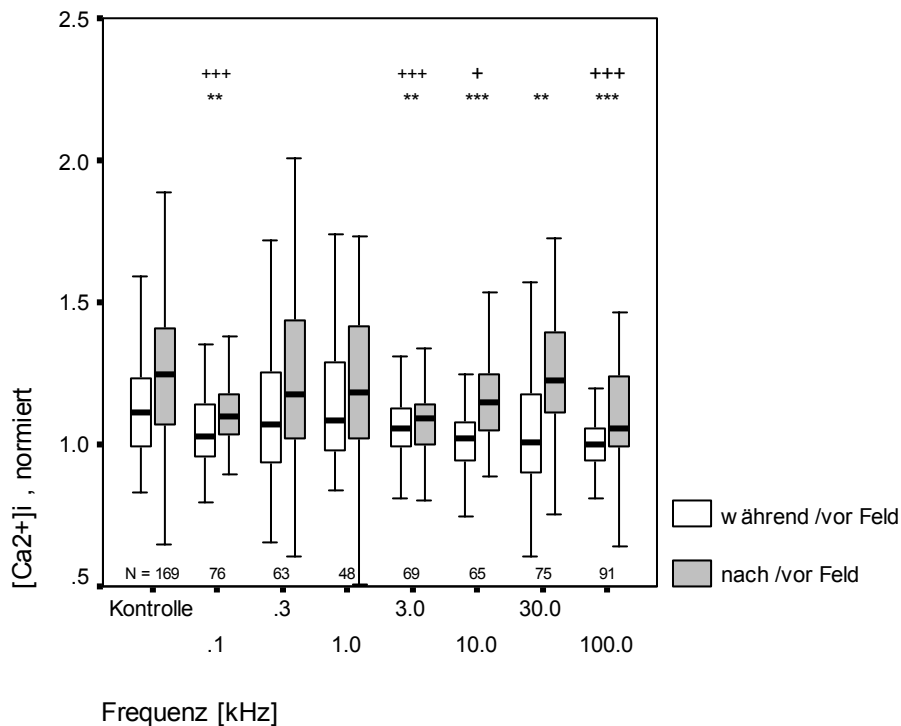


Abb. 5-11 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von HOS TE85 nach der Applikation von amplitudenmodulierten Sinusfeldern verschiedener Frequenz (durchschnittliche UVA-Dosis 15 kJ/m<sup>2</sup>). Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

In Versuchen mit erhöhter UVA-Belastung traten Verteilungsunterschiede schon eher, nämlich bereits während der Befeldung auf, die sich im Nachbeobachtungszeitraum manifestierten. Aus der veränderten Lage des Medians kann man zwei verschiedene Effekte ableiten (Abb. 5-12). Im unteren Frequenzbereich bis etwa 3 kHz wird die Verteilung schmäler und die mittlere Kalziumkonzentration nimmt im Vergleich zur Kontrolle ab. Mit Ausnahme der Frequenz um 1 kHz sind diese Unterschiede statistisch signifikant. Bei höheren Frequenzen verbreitert sich die Verteilung und verschiebt sich zu höheren Konzentrationswerten. Insbesondere in der Gruppe 30 kHz findet man deutliche Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Beobachtung spricht für eine synergistische Wirkung von Feld und UV-Strahlung in diesem Frequenzbereich.

Bei Befeldung mit Frequenzen bis 3 kHz existiert kaum ein Unterschied zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger UVA-Belastung relativ zur Kontrolle. Vergleicht man die absoluten Konzentrationen, treten nach erhöhter Strahlungsbelastung immer höhere Werte auf als nach niedriger Belastung. Diese sind jedoch immer kleiner als die entsprechenden Kontrollwerte. D.h., dass der UV-bedingte Anstieg der Kalziumkonzentration während der Feldapplikation geringer ist. Das weist auf eine potentielle Schutzwirkung des Feldes hin.

Unterschiede in der Verteilung zeigen sich vor allem in der Breite und der Schiefe der Verteilung und dem Auftreten von lokalen Dichtemitteln. Diese zeigen das Vorhandensein von Subpopulationen an und treten bei Frequenzen größer als 1 kHz, jedoch nicht bei 3 kHz auf. Gleichzeitig sind die Verteilungen dieser Gruppen, außer bei 30 kHz, deutlich weniger linksschief als die Kontrollen. Dieser Effekt wird verursacht durch das Herauslösen einer Subpopulation von Zellen mit erhöhter Kalziumkonzentration aus der Gesamtpopulation. Die mittlere Konzentration der Hauptpopulation wird durch den Einfluss des Feldes kaum verändert. Dieser Fakt manifestiert sich auch durch das Auftreten der zwei Dichtemittel.

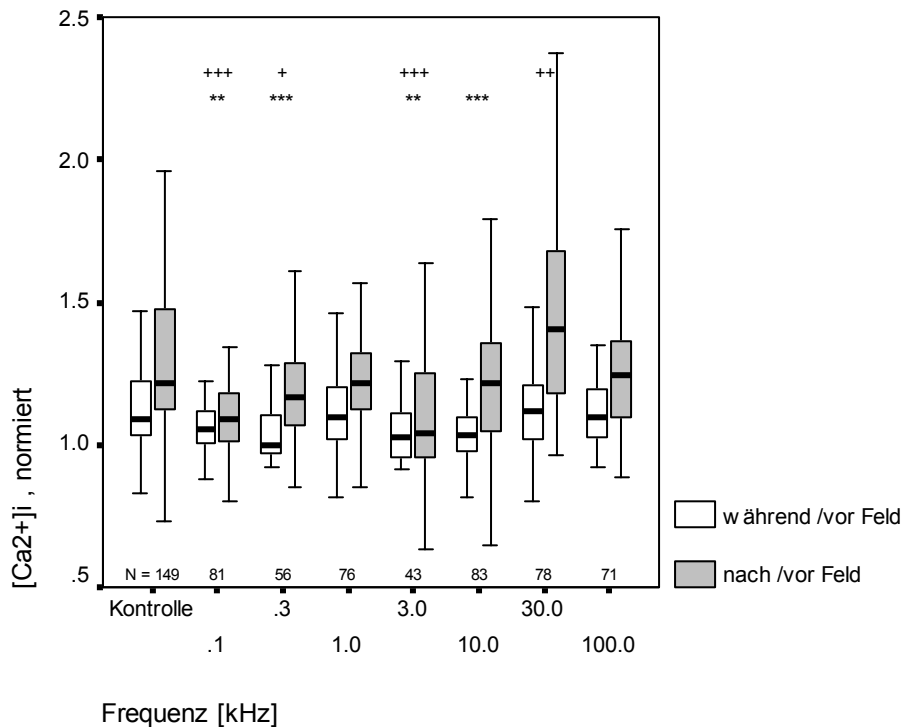


Abb. 5-12 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von HOS TE85 nach der Applikation von amplitudenmodulierten Sinusfeldern verschiedener Frequenz und erhöhter UVA- Belastung (durchschnittliche UVA- Dosis 30 kJ/m<sup>2</sup>). Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben (p<0.001 \*\*\*/+++, p<0.01 \*\*/++, p<0.05 \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

Abb. 5-13 fasst die oben dargestellten Ergebnisse zusammen. Sowohl in Versuchen mit normaler als auch in Versuchen mit erhöhter UVA-Belastung sind nur geringe Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration gegenüber der Kontrolle festzustellen. Ausnahmen bilden die Gruppen 100 Hz, 3 kHz und 30 kHz, die einen Nettoabfall bzw. einen Nettoanstieg des Kalziumgehalts zeigen. Unter normaler UVA-Belastung bzw. in frühen Phasen des Experiments kann ein Schutzmechanismus des Feldes vor weiterer oxidativer Schädigung der Zellen vermutet werden.

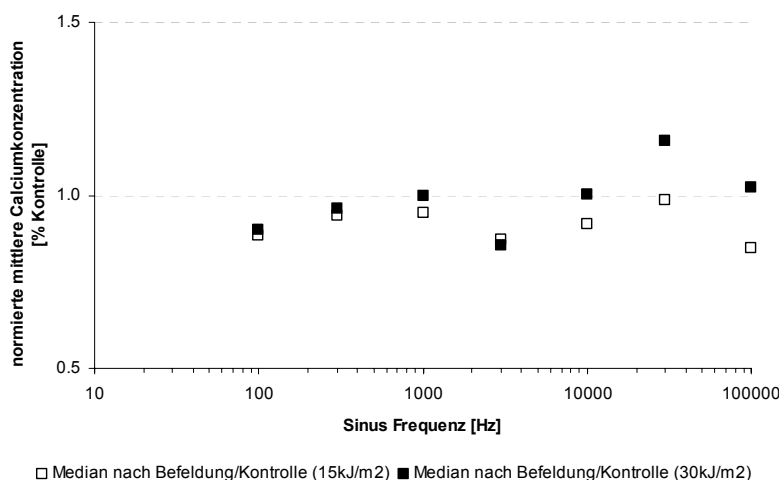


Abb. 5-13 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration von HOS TE85 mit normaler und erhöhter UVA-Belastung nach der Applikation von amplitudenmodulierten Sinusfeldern verschiedener Frequenz in Relation zur Kontrolle. Aufgetragen sind die Mediane der Verteilungen aus Abb. 5-12 bzw. Abb. 5-11.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, welche Rolle die Amplitudenmodulation von 16 Hz spielt. Dazu wurden modulierte und unmodulierte Befeldungsversuche mit der Trägerfrequenz 3kHz gegenübergestellt, die zwischen 200 und 600 Einzelzellen enthielten. Die Ergebnisse sprechen für eine geringfügig stärkere Wirkung (p<0.05) der modulierten Felder.

#### 5.1.4 Elektrische Stimulation von synchronisierten Osteosarcomazellen

Die oben dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass nur ein geringer Teil der gesamten Zellpopulation durch ein externes elektrisches Feld stimulierbar ist und dass es sich bei dieser Subpopulation um Zellen innerhalb einer bestimmten Zellzyklusphase handelt. Um zu untersuchen, ob sich die These erhärten lässt, wurden Befeldungsversuche an Aphidicolin- synchronisierten Zellen durchgeführt. Mit Hilfe von Messungen des intrazellulären Kalziumgehalts wurde die Stimulierbarkeit von HOS-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit von deren Progression durch den Zellzyklus (Beginn 1 h nach Wiedereintritt in Zyklus an G<sub>1</sub>/S, Ende max. 6h später) bewertet.

Um die Anzahl der freien Parameter einzuschränken, wurden nur folgende Feldvarianten eingesetzt:

- unipolare Rechteckpulse, 1.5 Hz (TV 20%), 200V/m (P)
- amplitudenmodulierte Sinusfelder, 3 kHz Trägerfrequenz, 16 Hz AM (100%), 200V/m (Sin AM)
- unmodulierte Sinusfelder, 16 Hz, 200V/m (Sin)

Alle Versuche wurden bei 37°C durchgeführt und die Zellen für 10min befeldet. Die UV-Dosis in diesen Versuchen lag mit 15kJ/m<sup>2</sup> deutlich unter der oben erwähnten Halbwertsdosis.

Wie bereits in Kap. 5.1.1.1 festgestellt wurde, kann auch der Einfluss anderer (feldunabhängiger) Faktoren, v.a. UV-Anregungslicht zu Erhöhungen des zellulären Kalziumspiegels führen. Das muss jedoch von potentiellen Feldeffekten deutlich getrennt werden. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten, unsynchronisierten Zellkulturen, scheint dies bei synchronisierten Kulturen aus folgenden Gründen möglich: die UV-Sensibilität ist im Zeitraum der beobachteten Feldwirkung relativ gering. Die Applikation elektrischer Felder kann jedoch deutliche Veränderungen der Kalzium-Konzentration, v.a. durch Peaks und sprunghafte Anstiege, hervorrufen. Bei Reaktionen, die vermutlich durch UV-Licht verursacht werden, treten seltener Peaks auf, es überwiegen langsame anhaltende Anstiege. Damit ergibt die Auswertung der Peakhäufigkeit ein sehr viel sichereres Maß als die oben benutzte Methode der Intervallanstiege, die ja auch durch UV ausgelöst werden können.

Obwohl man unter einem Peak eher ein scharfes Maximum mit steilen Flanken versteht, wurden bei der erfolgten Auswertung nicht nur solche Ereignisse, sondern auch sehr steile, peakähnliche Anstiege der Kalziumkonzentration mit anschließend stark erhöhtem Kalziumspiegel als Peaks gewertet.

Zunächst ist festzustellen, dass auch synchronisierte Kulturen auf Einzelzellniveau noch immer ein heterogenes Verhalten zeigen (Abb. 5-14). Das mag in der "Effektivität" der Synchronisation begründet liegen, die nie 100%ig war und zwischen den Versuchstagen schwankte. Der unmittelbare Nachweis der Zellzyklusphasen mit Fluoreszenzimaging im Anschluss an die Kalzium-Messungen war jedoch nicht erfolgreich. Alternativ erfolgte eine qualitative Bewertung mit Hilfe von FACS-Analysen an parallel geführten Zellkulturen. Diese erlaubt jedoch nur Aussagen über die Verteilung der einzelnen Phasen und die Vitalität der Gesamtpopulation.

Als Reaktion auf ein externes elektrisches Feld können verschiedenartige Veränderungen der internen Kalziumkonzentration beobachtet werden. Dazu gehören einfache Peaks (Abb. 5-14A-C), wiederholte Peaks bzw. Oszillationen (Abb. 5-14E-G) und langsamere, langanhaltende Veränderungen. Die Peaks können verschieden lang sein, und wiederholt und zu verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf die Feldapplikation auftreten. Daher scheint es keine einheitliche Latenzzeit bzw. Minstdauer für die Feldeinwirkung für HOS TE85 zu geben. Wenn sehr starke Peaks auftreten, findet man oft mehr oder weniger gleichzeitige Reaktionen in benachbarten Zellen, was auf die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation hinweist. Mit etwa der gleichen Häufigkeit wie Peaks treten langsame, aber anhaltende Veränderungen der Kalziumkonzentration auf. Meist handelt es sich dabei um Konzentrationsanstiege. Diese können auch Oszillationen oder Peaks überlagert sein (Abb. 5-14G). Zum Teil beobachtet man nur stärkere Fluktuationen der Kalziumkonzentration, die zu einer Nettoerhöhung führen (Abb. 5-14F, H). Im Fall hoher Basiskonzentrationen führt dieses veränderte Transportverhalten zum Absinken der internen Konzentration (Abb. 5-14J, L).

Bei Anwesenheit von EDTA in der Außenlösung nimmt die Intensität der beobachteten Reaktionen ab (Abb. 5-14D, H, L). Es können jedoch immer noch intrazelluläre Kalziumpeaks ausgelöst werden. Auch langsamere Veränderungen, die sowohl zur Erhöhung der Konzentration als auch zu deren Erniedrigung führen können, treten auf. Lediglich sehr schnelle, sprunghafte Erhöhungen der internen Kalziumkonzentration konnten bei Anwesenheit von EDTA nicht beobachtet werden. Das deutet

darauf hin, dass diese langfristigen und auch sehr starken Effekte durch verstärkten Influx extrazellulären Kalziums hervorgerufen werden.

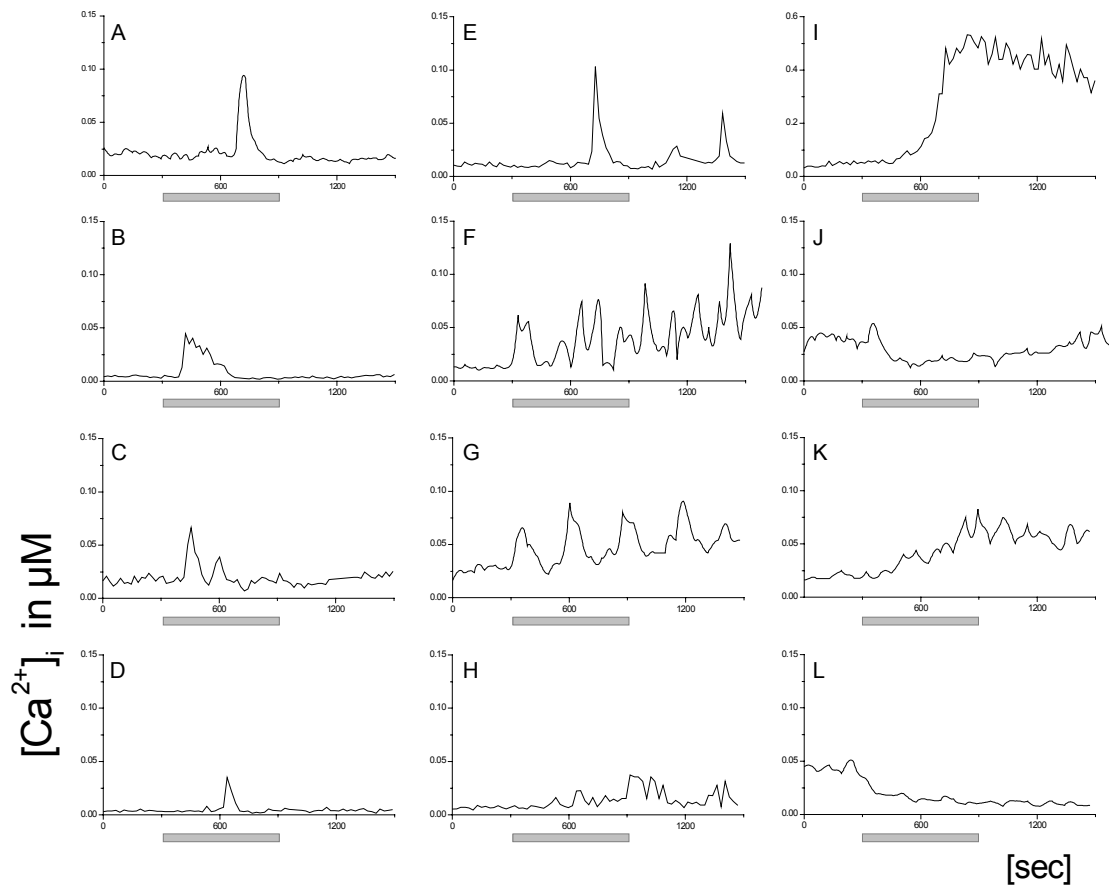


Abb. 5-14 Beispiele für Reaktionen synchronisierter Zellen auf Feldapplikation. Der Balken kennzeichnet das Befeldungsintervall. (D), (H), (L) in HANKS-Puffer mit 1mM EDTA, alle anderen in HANKS-Puffer mit 1mM  $\text{CaCl}_2$ .

Für das Entstehen von Peaks bzw. Oszillationen scheinen vor allem intrazelluläre Kalziumspeicher von Bedeutung zu sein. Der Influx externen Kalziums könnte als eine Art Verstärkungsfaktor dienen. Trotz dieser Heterogenität ist in nahezu allen Versuchen ein deutliches Zeitfenster für die (maximale) Stimulierbarkeit zu finden (Abb. 5-15). Das zeitliche Verhalten der Zellreaktion korreliert gut mit dem Anteil der S-Phasen in der Population. Zur Auswertung wurden alle Daten in 30minütige Klassen geordnet und anschließend Klassenmittelwerte gebildet (Abb. 5-16). Der Zeitpunkt der maximalen Peakhäufigkeit befindet sich in allen Versuchsgruppen vergleichbar im Bereich zwischen 2 und 3 Stunden nach Entfernen des Aphidicolinblockes. Somit zeigt sich eine erhöhte Sensibilität in der frühen S-Phase. Im Vergleich zum zeitlichen Verhalten der Reaktion auf andere Stimuli (Kap. 5.1.1), sind jedoch mehr oder weniger stark ausgeprägte reizspezifische Zeitfenster zu vermuten. Abb. 5-17 zeigt die mittleren Peakhäufigkeiten in den verschiedenen Versuchsgruppen, bestimmt zu den jeweiligen Zeitpunkten der maximalen Peakhäufigkeit aus Abb. 5-16. Außerdem ermöglicht diese Abbildung den Vergleich zu entsprechenden Experimenten an unsynchronisierten Zellkulturen. Synchronisierte Kontrollen zeigen im Vergleich zu unsynchronisierten Zellkulturen eine etwas höhere Reaktionshäufigkeit. Es ist aber nicht klar, ob das dem Einfluss des verwendeten Inhibitors oder der geringeren Zahl der Experimente zuzuschreiben ist.

Insgesamt findet man in den Kontrollen und in den Gruppen geringer Feldstärke (P10, P100) nur wenige Peaks. Ihr Anteil ist mit dem in befeldeten unsynchronisierten Kulturen vergleichbar. Diese geringe Anzahl an Peaks macht es in diesen Gruppen schwierig, einen Zeitpunkt der maximalen Peakhäufigkeit zu bestimmen. Größere Abweichungen von den übrigen Gruppen sind die Folge. In allen anderen Gruppen ist die Anzahl der Peaks leicht erhöht, im Fall von gepulsten Feldern hoher Feldstärke sogar deutlich erhöht. Noch höhere Feldstärken konnten mit der verwendeten Elektrodenanordnung nicht realisiert werden.

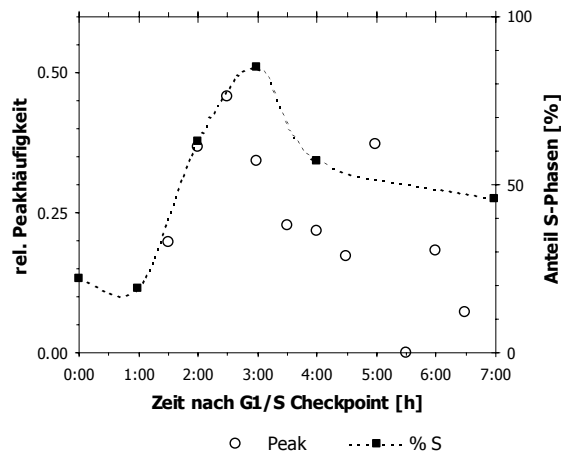


Abb. 5-15 Zeitlicher Verlauf der Peakhäufigkeit und des S-Phasenanteils der Zellpopulation.

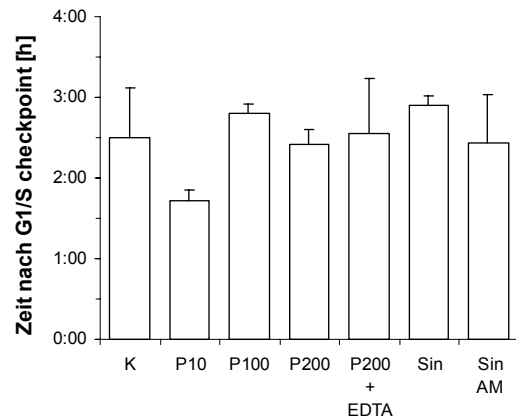


Abb. 5-16 Zeitpunkt der maximalen Peakhäufigkeit in den verschiedenen Versuchsgruppen. K: Kontrolle, P10/100/200: unipolare Rechteckpulse mit 10/100/200V/m, Sin: unmodulierter Sinus 200V/m, Sin AM: amplitudenmodulierter Sinus 200V/m.

Aufgrund der unterschiedlichen Peakhäufigkeiten bei verschiedenen Feldstärken kann man von einer Schwellenfeldstärke ausgehen, oberhalb derer deutliche Effekte auftreten. Unterhalb dieser Schwelle, nämlich bis ca. 100 V/m treten sowohl in den unsynchronisierten als auch in den synchronisierten Zellkulturen nur geringe Effekte auf.

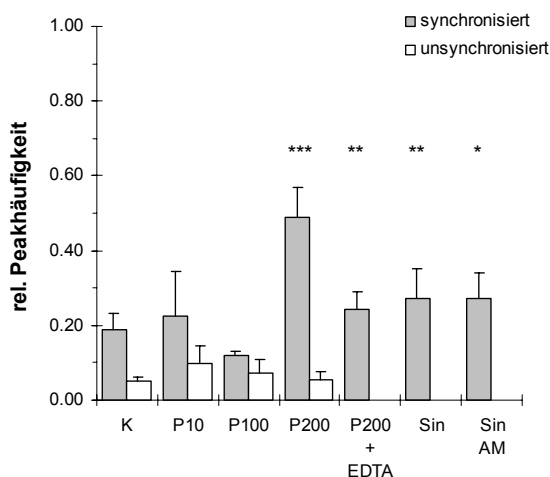


Abb. 5-17 Mittlere maximale Peakhäufigkeit synchronisierter und unsynchronisierter Zellkulturen. Abkürzungen siehe Abb. 5-16.

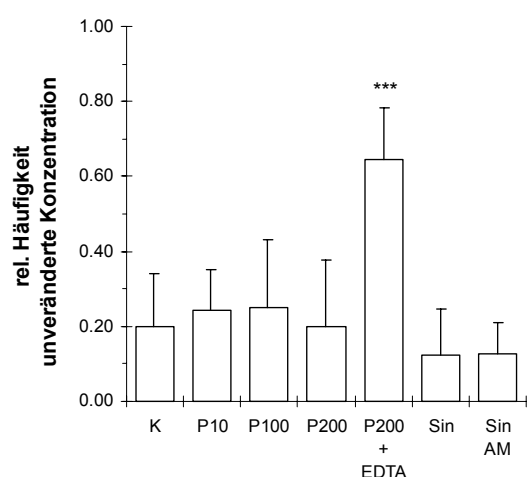


Abb. 5-18 Relative Häufigkeit von Zellen mit während des Versuchs unveränderter Kalziumkonzentration innerhalb einer Population von synchronisierten HOS-Zellen. Abkürzungen siehe Abb. 5-16.

Neben der Veränderung in der mittleren Peakhäufigkeit in Abhängigkeit vom Zellstadium beobachtet man auch einen erhöhten Anteil langsamer Kalziumanstiege während des Befeldungsintervalls im Vergleich zu den Kontrollen. Das gilt für alle eingesetzten Felder, unabhängig von Pulsform, Frequenz und Feldstärke, jedoch nicht in Anwesenheit von EDTA.

Aufschluss über den Mechanismus des UV-induzierten Kalziumanstiegs erhält man, wenn nur derjenige Anteil der Zellen, deren Kalziumkonzentration sich weder durch den Einfluss der UV-Belichtung noch des elektrischen Feldes verändert, betrachtet wird. Abb. 5-18 zeigt, dass dieser Anteil in Kontrollen und befeldeten Gruppen etwa gleich groß ist. Nur in Anwesenheit von EDTA in der Außenlösung ist dieser Anteil stark erhöht ( $p < 0.001$ , U-Test). Das impliziert, dass der UV-abhängige Kalziumanstieg primär durch extrazelluläres Kalzium ausgelöst wird.

Abb. 5-19 illustriert noch einmal den ungefähren zeitlichen Verlauf der Feldempfindlichkeit in verschiedenen Versuchsgruppen. Die dabei auftretenden Unterschiede wurden mit dem U-Test getestet und sind statistisch signifikant (Abb. 5-17). Es wird deutlich, dass die maximale Empfindlichkeit der Zellen für elektrische Felder an ein bestimmtes spezifisches Zellstadium gebunden ist.

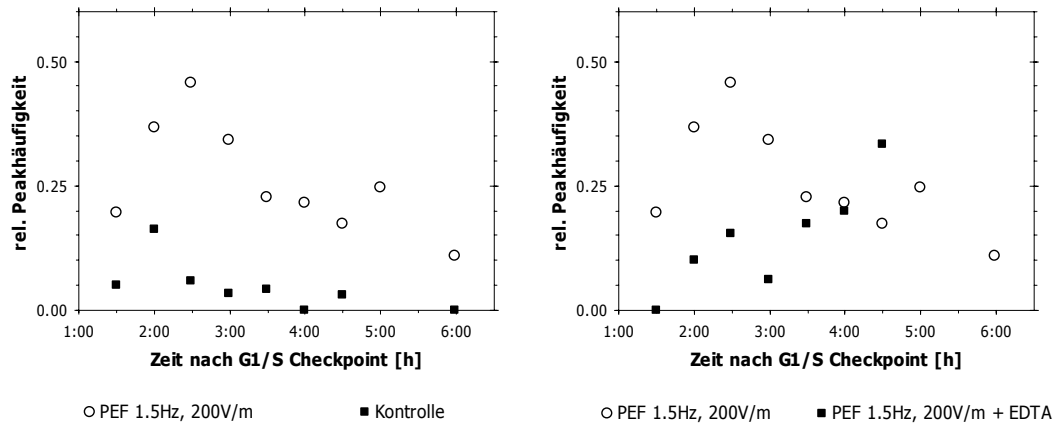


Abb. 5-19 Zeitlicher Verlauf der Peakhäufigkeit bei Applikation von Feldpulsen. Links: im Vergleich zu Kontrollen, rechts: in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium.

Um einen Vergleich mit den unsynchronisierten Zellen herzustellen, wurde die dort verwendete Auswertemethode auch auf synchronisierte Zellen angewandt. Abb. 5-20 zeigt die resultierenden Verteilungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von synchronisierten HOS-Zellen. Obwohl in den befeldeten Gruppen ein signifikanter Anteil von Kalziumpeaks auftrat, manifestiert sich das nicht in einer Verschiebung der Verteilung zu höheren Konzentrationen. Die mittleren Kalziumkonzentrationen sind in den befeldeten Gruppen sogar geringer als in der Kontrollgruppe. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei Anwesenheit von EDTA in der Außenlösung zu sehen. Das spricht ebenfalls dafür, dass der Kalziumanstieg in den Kontrollen, der überwiegend UV-bedingt ist, von extrazellulärem Kalzium abhängig ist. Man kann weiterhin ableiten, dass die beobachteten Feldeffekte kaum zu einer langfristigen Erhöhung der Kalziumkonzentration führten wie sie z.B. bei langsamen, anhaltenden Anstiegen aufgetreten wäre. Eventuell wirkt der Feldeffekt sogar schützend für die Zelle, indem z.B. durch Inaktivierung von Kalziumkanälen oder erhöhte Pumpleistung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ein langsamer Anstieg der intrazellulären Konzentration verhindert wird.

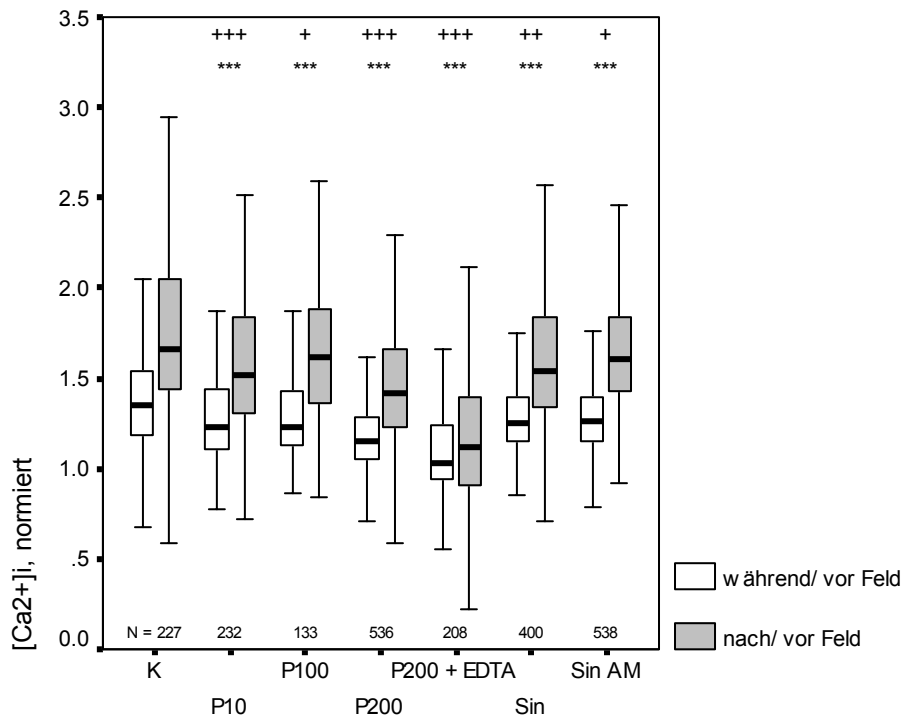


Abb. 5-20 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von synchronisierten HOS TE85 nach der Feldapplikation. Legende siehe Abb. 5-16. Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/\*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

### 5.1.5 Elektrische Stimulation von Osteoblasten

Analog zur Stimulation von Osteosarcomazellen wurden sowohl gepulste als auch sinusförmige elektrische Felder an primären Osteoblasten eingesetzt. Da diese Zellen sich aufgrund ihres hohen Polysaccharidgehalts und aufgelagerter extrazellulärer Matrix nur schwer mit Farbstoff beladen lassen, sind in dieser Serie jedoch nur wenige Versuche enthalten. Daher rühren größere Streubreiten und eine geringere statistische Power.

Während bzw. nach der Applikation von gepulsten Feldern wurde nicht in allen Gruppen ein Nettoanstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration festgestellt (Abb. 5-21). Im mittleren Feldstärkebereich (30 – 300 V/m) ist vor allem während der Befeldung die Verteilung der Kalziumkonzentration verbreitert und gegenüber dem Ausgangszustand erhöht. Das lässt auf heterogene Reaktionen der Zellen schließen. Außer in der Gruppe 100 V/m ist die Kalziumkonzentration nach der Befeldung aber wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt und damit geringer als in der Kontrollgruppe. Man kann daher vermuten, dass die Veränderungen in den Verteilungen der Kalziumkonzentration überwiegend durch Kalziumpeaks hervorgerufen wurden.

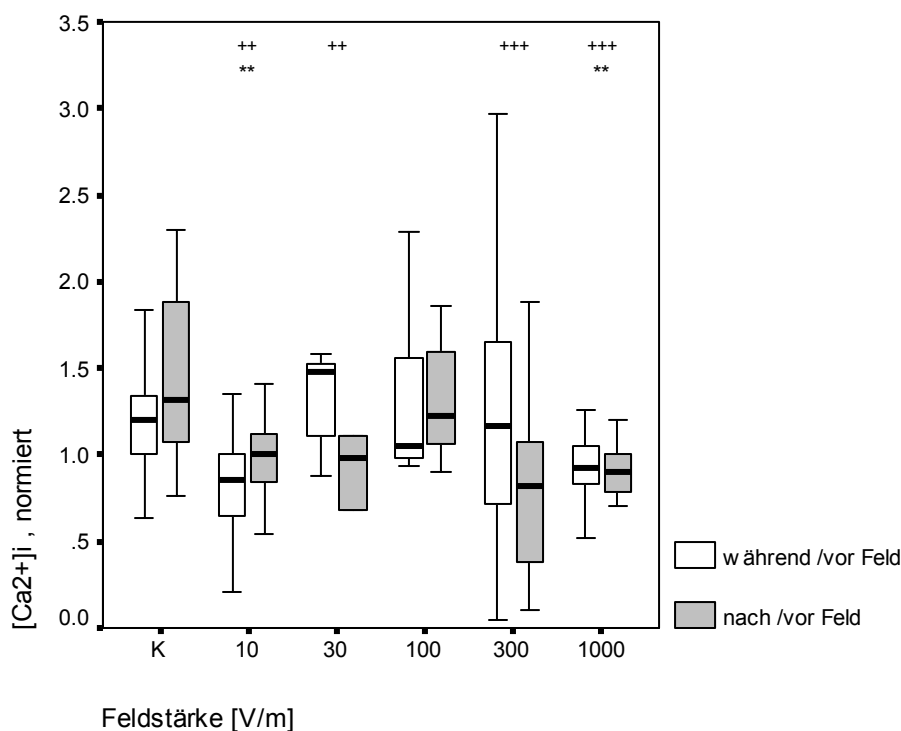


Abb. 5-21 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von primären Osteoblasten nach der Applikation von PEMF verschiedener Feldstärke. Die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++;  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

Aufgrund der experimentellen Schwierigkeiten wurde bei der Untersuchung der Osteoblasten nur mit ausgewählten Frequenzen von Sinusfeldern gearbeitet. Sowohl in der befeldeten als auch in der Kontrollgruppe beobachtet man im Verlauf des Experiments einen Nettoanstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abb. 5-22). In den befeldeten Gruppen fällt dieser jedoch etwas geringer aus als in den Kontrollen. Möglicherweise sind auch diese Verteilungsunterschiede das Ergebnis eines langsamen Influx-abhängigen Anstieges in den Kontrollen und einem vermehrten Anteil von Kalziumpeaks in der Feldgruppe.

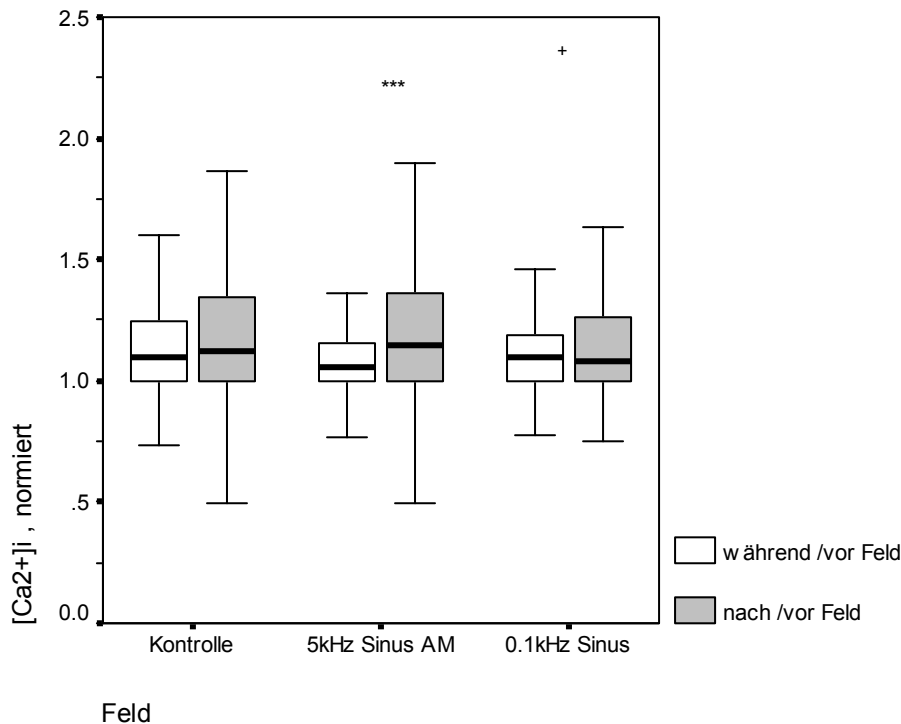


Abb. 5-22 Verteilung der intrazellulären Kalziumkonzentration von primären Osteoblasten nach der Applikation von (amplitudenmodulierten) Sinusfeldern (durchschnittliche UVA- Dosis 15 kJ/m<sup>2</sup>). Die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

## 5.2 Der Redoxstatus

### 5.2.1 Intrazelluläre Messungen des Redoxstatus an Einzelzellen

#### 5.2.1.1 Der Einfluss gepulster elektrischer Felder auf den Redoxstatus von Osteosarcomazellen

Zeitaufgelöste Messungen des Redoxzustands von HOS TE85 wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H<sub>2</sub>DCFDA und gleichzeitig zu den Kalziummessungen vorgenommen. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs wird unspezifisch durch reaktionsfreudige Substanzen wie ROS im Zytoplasma erhöht. Die Auswertung der Versuche erfolgte analog zu den Kalziummessungen.

Die Fluoreszenzintensitäten sind – wie auch bei Fura-2 – nicht normalverteilt und oft auch nicht eingipflig. Nach der Befeldung wird vermehrt die Auftrennung in verschiedene Subpopulationen sichtbar. Daher mussten für die statistische Auswertung nichtparametrische Verfahren eingesetzt werden. Trotzdem ist die Methode relativ unempfindlich, da auch durch die bewusste Erhöhung des oxidativen Stresses z.B. durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Erhöhung des Belichtungstaktes nur geringe Änderung des Fluoreszenzsignals von maximal 10% auftraten.

Unter dem Einfluss niederfrequent gepulster Felder beobachtet man vor allem eine Veränderung der Verteilungsform, d.h. Verschiebung zu einer eher rechtsschiefen Lage. Die Lage des Medians wird dabei kaum beeinflusst. Diese Veränderungen sind jedoch nur in zwei Gruppen schwach signifikant. Unter zusätzlichem oxidativen Stress durch die Zugabe von SIN-1 wird die Fluoreszenzintensität weiter erhöht. Diese Bedingungen lassen sogar einen statistisch signifikanten Feldeinfluss im mittleren Feldstärkebereich erkennen. Die Gruppen 10 V/m und 1 kV/m, die bereits unter normalen oxidativen Bedingungen schwach signifikant waren, wiesen bei erhöhtem oxidativem Stress sehr große



Streubreiten auf, so dass keine sichere Aussage zu ihrer Wirkung gemacht werden konnte (Abb. 5-23).

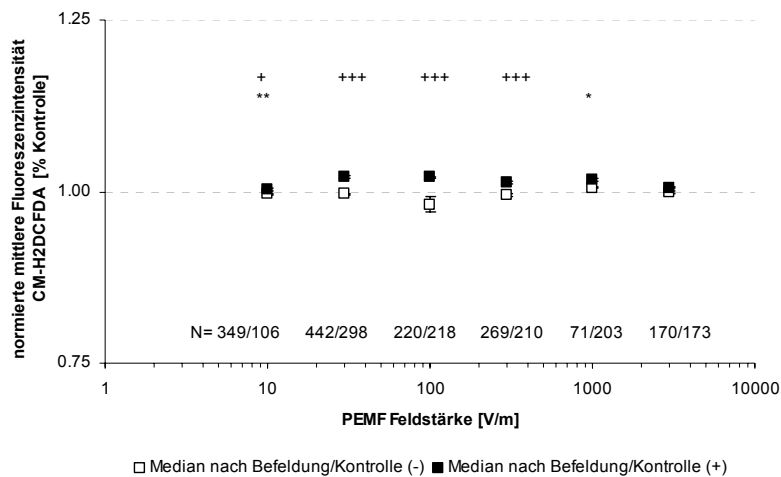


Abb. 5-23 Der Redoxzustand von HOS TE85 ohne (-)/mit (+) zusätzlichem oxidativen Stress nach der Applikation von PEMF verschiedener Feldstärke in Relation zur Kontrolle. Aufgetragen sind die Mediane der Verteilungen und deren Standardabweichung. Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (-) ohne zusätzlichen oxidativen Stress gegen Kontrolle, (+) mit zusätzlichem oxidativen Stress gegen Kontrolle symbolisiert.

#### 5.2.1.2 Der Einfluss sinusförmiger elektrischer Felder auf den Redoxstatus von Osteosarcomazellen

Amplitudenmodulierte Sinusfelder bewirkten ähnlich wie bei der Kalziumkonzentration während ihrer Applikation geringere Redox-Werte im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Befeldung nimmt die Fluoreszenzintensität stärker zu und ist gegenüber den Kontrollen erhöht. Jedoch ist auch hier die Gesamtänderung der Fluoreszenzintensität gering und die Streubreite in einzelnen Versuchsgruppen groß, so dass die statistischen Ergebnisse nicht immer vertrauenswürdig erscheinen.

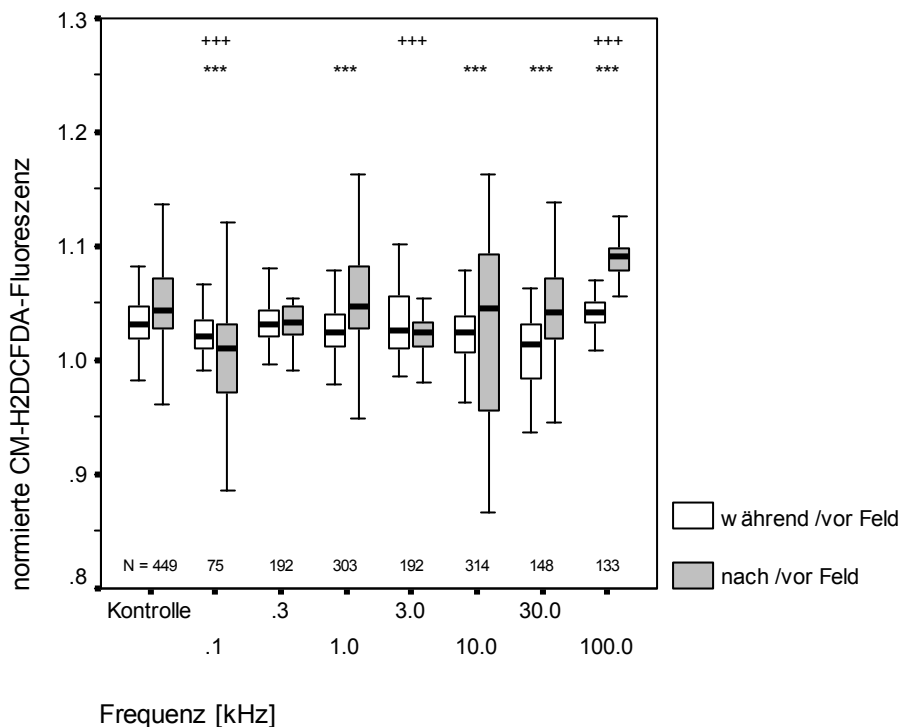


Abb. 5-24 Der Redoxzustand von HOS TE85 während und nach der Applikation von amplitudenmodulierten Sinusfeldern verschiedener Frequenz (durchschnittliche UVA-Dosis  $30 \text{ kJ/m}^2$ ). Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*/+++,  $p < 0.01$  \*\*/++,  $p < 0.05$  \*/+), wobei (\*) während Feld gegen Kontrolle, (+) nach Feld gegen Kontrolle symbolisiert.

Da in diesen Versuchen Redoxstatus und Kalziumkonzentration der Zellen simultan gemessen wurden, kann durch eine Korrelationsanalyse untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen beiden Parametern gibt. Niederfrequent gepulste Felder bewirkten eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die abhängig von der elektrischen Feldstärke war. Erhöhter oxidativen Stress verstärkte diesen Effekt, so dass man eine synergistische Wirkung von Feld und ROS vermuten kann. Jedoch sind weder die Einzelwerte noch die Gruppenmittelwerte der Fluoreszenz statistisch signifikant miteinander korreliert.

Modulierte Sinusfelder im höheren Frequenzbereich rufen während ihrer Applikation eine gegenüber der Kontrolle niedrigere Fluoreszenz von sowohl Fura-2 als auch CM-H<sub>2</sub>DCFDA hervor. Nach der Befeldung sind beide Parameter gegenüber der Kontrolle erhöht. Damit ergibt sich für die Gruppenmittelwerte in der Nachbeobachtungsphase ein Korrelationskoeffizient (nach Spearman) von 0.71, welcher mit  $p=0.046$  sogar schwach signifikant ist.

## 5.2.2 Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch extrazelluläre Messungen an Zellpopulationen

### 5.2.2.1 Stimulation von Zellpopulationen durch niederfrequente Felder

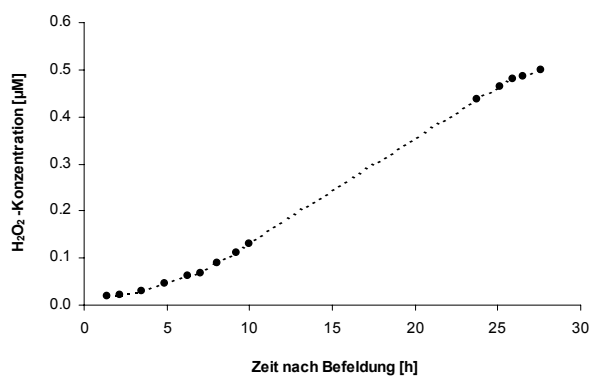


Abb. 5-25 Zeitlicher Verlauf der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium von primären Osteoblasten nach kapazitiv eingekoppelter Befeldung (16 Hz).

Um den Zusammenhang zwischen Feldwirkung und oxidativem Stress zu untersuchen, wurde die Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium von befeldeten und unbefeldeten Zellen über mehrere Stunden nach der Feldapplikation verfolgt (Abb. 5-25). Diese nimmt nach der Befeldung stetig zu und erreicht nach einer Zeit von mehr als 24 Stunden langsam ein Plateau. Das kann aber auch lediglich die abnehmende Vitalität der Zellen widerspiegeln, die sich während des gesamten Versuchs nur in Puffer befanden. Eine allgemeine Intensitätszunahme aller Proben, die beispielsweise durch Oxidation

hervorgerufen wird, konnte durch die Verwendung entsprechender mitlaufender Leerwerte und Standards korrigiert werden. Aus dem nahezu linearen Kurvenabschnitt der ersten 6-8 h wurde die Wasserstoffperoxid-Produktion in [μM/h] berechnet, die anschließend auf den Wert der unbefeldeten Zellen normiert wurde.

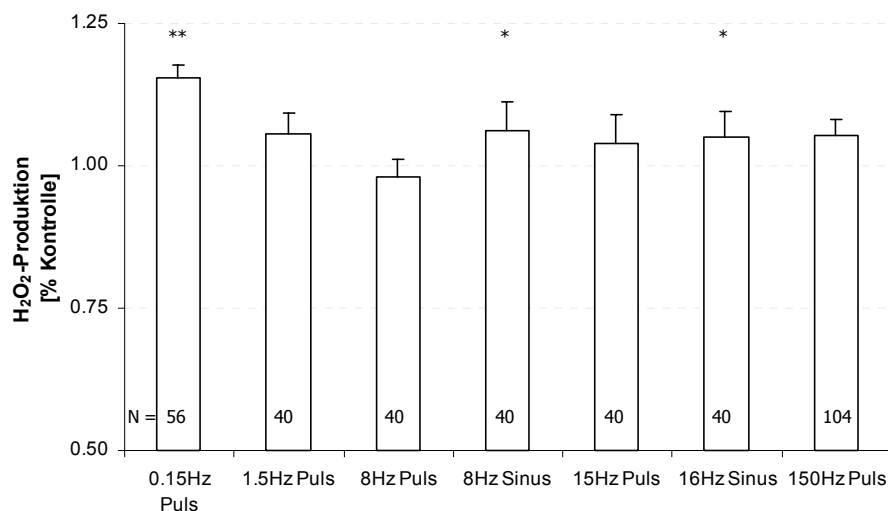


Abb. 5-26 Relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von HOS TE85 (HOS, n=5) nach Applikation direkt eingekoppelter niederfrequenter Puls- und Sinusfelder. Die Probenzahl in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p<0.001$  \*\*\*,  $p<0.01$  \*\*,  $p<0.05$  \*).

Die Applikation niederfrequenter Felder bewirkt in allen Fällen eine leichte Zunahme der Peroxid-Produktion von Osteosarcomazellen gegenüber unbefeldeten Kontrollen (Abb. 5-25). Tendenziell steigt diese Aktivität umso mehr, je niedriger die Frequenz des applizierten Feldes ist. Im Vergleich von sinusförmigen und gepulsten Feldern dergleichen Frequenz ist eine etwas stärkere Wirkung der Sinusfelder festzustellen. Außerdem üben sinusförmige Felder gegenüber unipolar gepulsten Feldern einen stärkeren Effekt aus. Deutlich signifikante Unterschiede zur Kontrolle finden sich jedoch nur in der Gruppe 0.15 Hz.

### 5.2.2.2 Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder

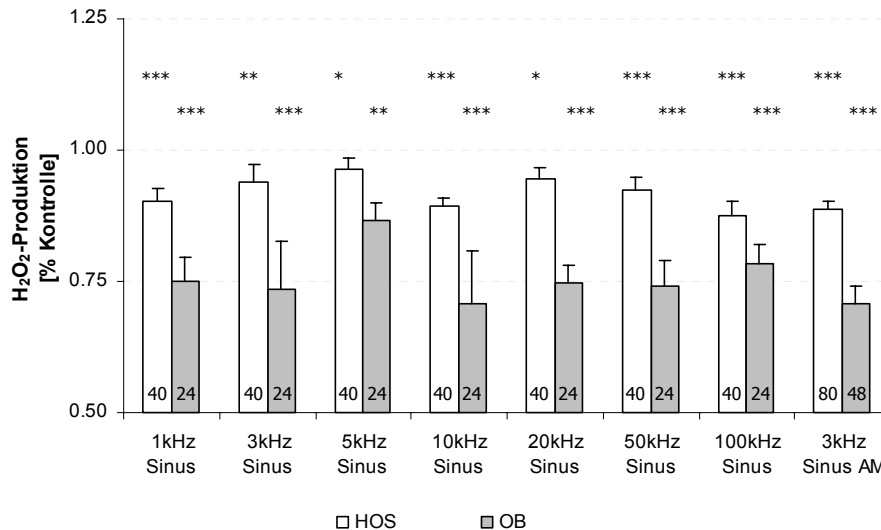


Abb. 5-27 Relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von primären Osteoblasten und HOS TE85 nach Applikation direkt eingekoppelter Sinusfelder. Die Probenzahl in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben (p<0.001 \*\*\*, p<0.01 \*\*, p<0.05 \*).

Prinzipiell verhalten sich primäre Zellen und Tumorzellen in Bezug auf ihre Peroxidase-Aktivität nach Befeldung sehr ähnlich (Abb. 4-28). In beiden Zelltypen finden sich bei den Kontrollen die höchsten Werte. Obwohl alle befeldeten Gruppen eine gegenüber der Kontrolle verminderte Peroxidase-Aktivität aufweisen, kann man nicht von einem frequenzabhängigen Effekt sprechen. Der Vergleich zwischen amplitudenmoduliertem und unmoduliertem Sinusfeld (3 kHz und 3 kHz Sinus AM) erbringt ebenfalls keinen Unterschied in der Feldwirkung.

Auffällig ist jedoch, dass die Stärke des beschriebenen Effekts bei beiden Zelltypen verschieden ist. Während er bei den Osteosarcomazellen nur wenig ausgeprägt ist (mittlere Differenz zur Kontrolle 9%), ist er bei primären Zellen dreimal stärker (mittlere Differenz zur Kontrolle 27%) vorhanden. Die statistische Analyse liefert für primäre Osteoblasten hochsignifikante Unterschiede zur Kontrolle bei allen applizierten Frequenzen. Die Frequenzen sind jedoch untereinander nicht verschieden. Für HOS-Zellen sind die Ergebnisse weniger signifikant. Herausragend sind vor allem die Gruppen 100 kHz und 10 kHz sowie 3 kHz AM.

### 5.2.3 Bestimmung der NO-Produktion durch extrazelluläre Messungen an Zellpopulationen

#### 5.2.3.1 Stimulation von HOS- Zellpopulationen durch niederfrequente Felder

Wird Stickoxid (NO<sup>•</sup>), das ein wichtiges Signalmolekül ist, von den Zellen produziert, gelangt es auf Grund seiner geringen Größe und seiner Eigenschaft, passiv die Zellmembran zu durchdringen, sehr schnell in die Umgebung der Zellen. Da dieses Molekül aber außerdem Radikalcharakter hat, ist seine Lebenszeit im Medium mit wenigen Sekunden relativ kurz. Durch chemische Reaktionen wird es im Weiteren zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und schließlich zu Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) umgewandelt. Der Nachweis dieser Endprodukte im Zellkulturmedium unmittelbar nach elektrischer Stimulation erlaubt daher

Schlussfolgerungen über die NO-Produktion der Zellen. Diese Messungen erfolgten über eine empfindliche fluorometrische Methode, die Konzentrationen ab 50nM auflösen kann.

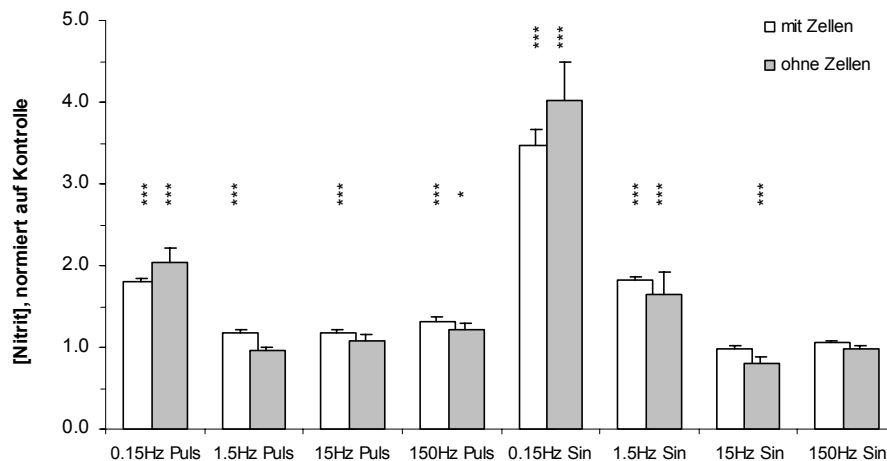


Abb. 5-28 Relative Nitritkonzentration im Zellkulturmedium von HOS direkt nach Stimulation mit niederfrequenten Feldern. Die Gruppen mit Zellen enthielten je 32 Proben, die Gruppen ohne Zellen enthielten je 16 Proben. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Messungen der Nitritkonzentration im Medium (Abb. 5-28) nach Applikation von direkt eingekoppelten niederfrequenten Feldern zeigen einen starken Anstieg im unteren Frequenzbereich. Jedoch besteht kaum ein Unterschied zwischen der Nitritkonzentration in Zellkultur und in reinem Medium. Demzufolge muss es sich um Elektrodeneffekte handeln. Es ist offensichtlich, dass dieser Effekt mit

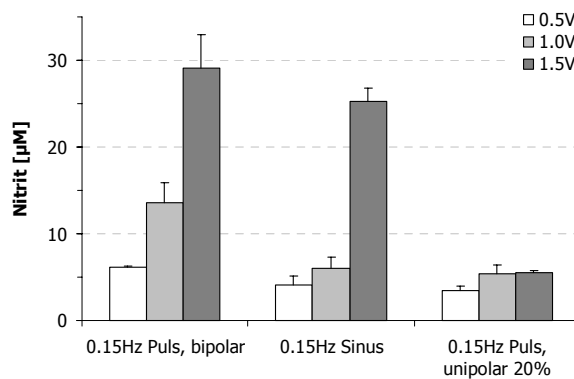


Abb. 5-29 Relative Nitritkonzentration im Zellkulturmedium von HOS in Abhängigkeit von Frequenz und Amplitude.

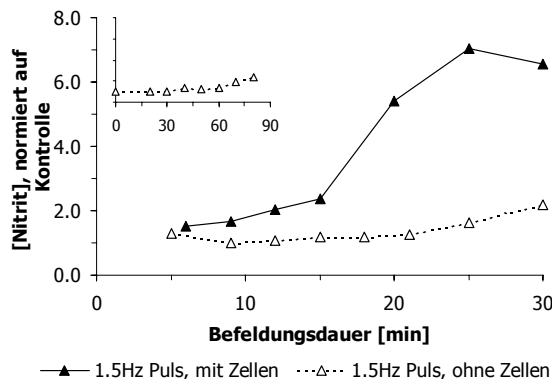


Abb. 5-30 Relative Nitritkonzentration im Zellkulturmedium von HOS in Abhängigkeit von der Befeldungsdauer.

der Frequenz korreliert und außerdem bei Sinuswellen stärker ist als bei unipolaren Pulsen. Deshalb kann die Ladungsbalance als Ursache ausgeschlossen werden und es wird klar, dass die Nitritakkumulation im Medium das Ergebnis irreversibler Prozesse ist. Für diesen Effekt spielt vermutlich eher die Gesamtdauer, in der elektrochemische Reaktionen ablaufen können, eine Rolle. Man erwartet daher, dass die stärkste Wirkung von bipolaren Pulsen verursacht wird, gefolgt von Sinuswellen und monopolaren Pulsen. Diese Annahme wird durch Messungen bestätigt (Abb. 5-29). Zusätzlich lässt sich zeigen, dass der Effekt mit der Elektrodenspannung zusammenhängt.

Untersuchungen zur Kinetik der Nitritproduktion im Medium zeigen jedoch Unterschiede zwischen der Zellkultur und dem reinen Medium. Während die Konzentration im Medium langsam und gleichmäßig ansteigt, beobachtet man in Anwesenheit von Zellen einen S-förmigen Verlauf. Die Konzentration wächst nach ca. 15 Minuten plötzlich, erreicht aber gegen Ende des Experiments ein Plateau. Das lässt darauf schließen, dass zelluläre Prozesse am Zustandekommen dieses Ergebnisses beteiligt sind.

### 5.2.3.2 Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder

Die elektrische Stimulation mit hohen Frequenzen bewirkt über den gesamten Frequenzbereich eine gegenüber den Kontrollen verminderte Nitritkonzentration im Medium. Nahezu übereinstimmendes Verhalten zeigen die Zellen, die sich in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase befinden. Hier wirken fast alle Frequenzen gleichermaßen gut, lediglich im mittleren Frequenzbereich ist der konzentrationsmindernde Einfluss der Befeldung weniger stark ausgeprägt. Zellen der G<sub>0</sub>- und S-Phase lassen sich in Bezug auf ihre NO-Produktion nach elektrischer Stimulation ebenfalls in eine Gruppe zusammenfassen. Qualitativ sind die Ergebnisse der einzelnen Frequenzen denen der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase vergleichbar, der Effekt ist jedoch weniger stark. Auch hier zeigen sich im Bereich um 20 kHz die geringsten Konzentrationseffekte.

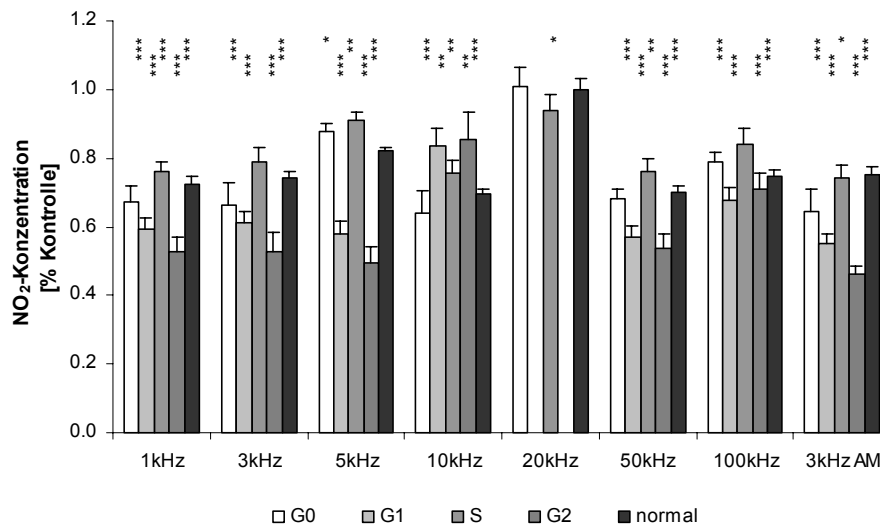


Abb. 5-31 Relative NO<sub>2</sub>-Produktion von HOS TE85 verschiedener Zellzyklusphase nach Applikation hochfrequenter Sinusfelder. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben (p<0.001 \*\*\*, p<0.01 \*\*, p<0.05 \*).

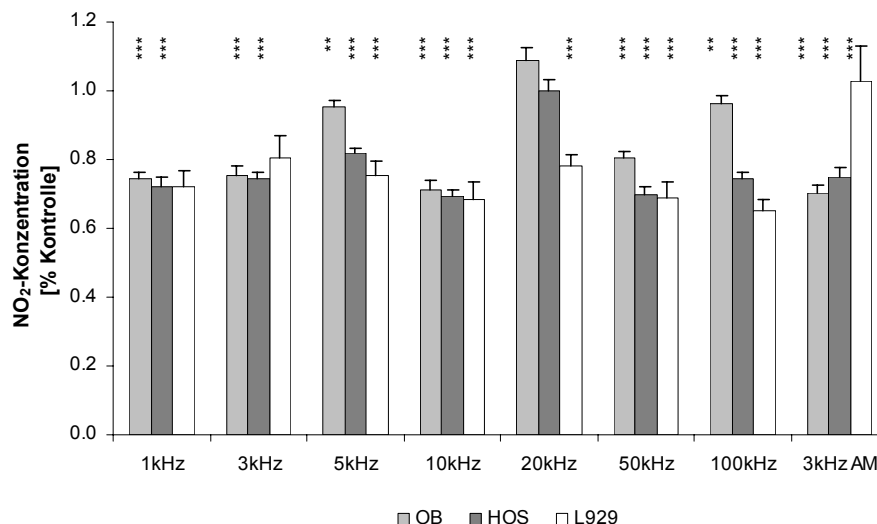


Abb. 5-32 Relative NO<sub>2</sub>-Produktion verschiedener Zelltypen nach Applikation hochfrequenter Sinusfelder. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben (p<0.001 \*\*\*, p<0.01 \*\*, p<0.05 \*).

Der Vergleich verschiedener Zelltypen zeigt nur geringe Unterschiede in der Nitritkonzentration nach elektrischer Stimulation. Es findet in den meisten Fällen eine Verminderung gegenüber den Kontrollen statt. Das zeigt, dass es sich hierbei nicht um eine spezifische Reaktion von Knochenzellen, sondern um einen generellen Effekt handelt. Auffällig ist jedoch, dass die Reaktionen innerhalb der Fibroblastenlinie L929 sehr gleichmäßig sind, lediglich amplitudenmodulierte Sinusfelder zeigten gar keine Wirkung. Die Gegenüberstellung der Krebslinie HOS und primärer Osteoblasten erbringt überraschenderweise eine stärkere Beeinflussung von HOS-Zellen durch das applizierte Feld. Für die

Knochenzellen tritt der mit Abstand geringste Effekt bei 20 kHz auf. Mit geringem Signifikanzniveau heben sich auch 100 kHz und der Bereich von 3-5 kHz von den anderen Frequenzen ab.

#### 5.2.4 Zellfreie Versuche

Wie sich bereits im letzten Abschnitt angedeutet hat, besitzt die Art der Feldapplikation in das Medium eine entscheidende Bedeutung für die Messergebnisse. Insbesondere die Parameter, die mit oxidativem Stress zusammenhängen wie Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , scheinen dafür besonders empfindlich zu sein. Es wurde deshalb im zellfreien System untersucht, ob das elektrische Feld und der damit verbundene Ladungstransfer per se in der Lage sind, derartige Konzentrationen von Nitrit im Medium hervorzurufen.

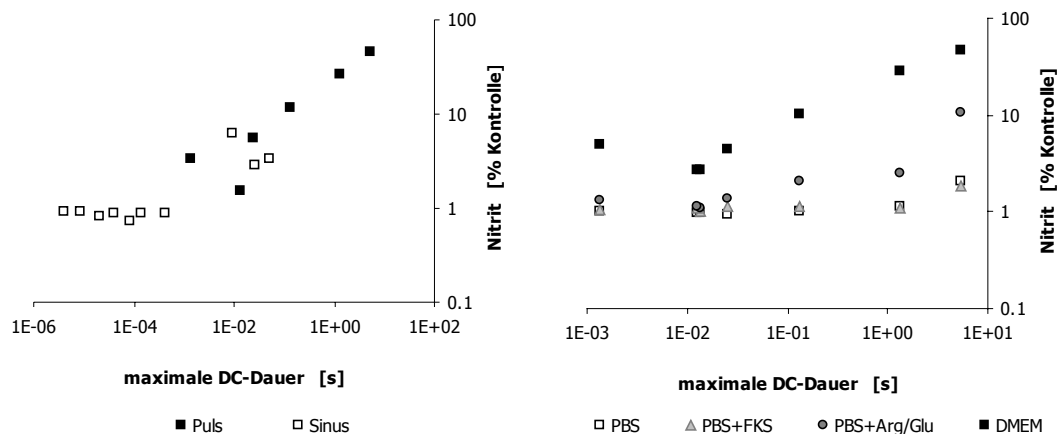


Abb. 5-33 Relative  $\text{NO}_2^-$  Konzentration in Zellkulturmedium (links, DMEM) und Puffer (rechts) nach Applikation direkt eingekoppelter Felder (0.1 Hz bis 100 kHz).

Wie Abb. 5-33 zeigt, finden durch den Stromfluss elektrochemische Reaktionen in der Lösung statt, die u.a. zur Zersetzung organischer Lösungsbestandteile führen können. Nachfolgende Redoxreaktionen könnten dann die nachgewiesenen Stickstoffverbindungen bilden. Dieser Effekt hängt sehr stark von der Frequenz und der Wellenform ab; extrem niederfrequente gepulste Felder entsprechen einer unterbrochenen Gleichspannung. Deswegen wurde in der Darstellung die Nitritkonzentration gegen eine effektive Gleichspannungsdauer aufgetragen. Diese ergibt sich für gepulste Felder aus dem Tastverhältnis und für Sinusfelder aus dem Effektivwert ( $1/\sqrt{2} \cdot U_0$ ) der Elektrodenspannung. Dass dieses Verfahren plausible Werte liefert, zeigt die gute Übereinstimmung von Puls- und Sinusdaten (Abb. 5-33, links). Es wird deutlich, dass unterhalb einer Mindestzeit, die der Spannungspuls andauert, keine Stickstoffverbindungen gebildet werden. Die entsprechende Frequenz liegt zwischen 100 Hz und 100 kHz.

Es wird außerdem deutlich, dass der beobachtete Effekt von der Zusammensetzung der Lösung abhängt. In reinem Phosphatpuffer kann man kaum Stickstoffverbindungen nachweisen. Umso größer der Protein- und Aminosäurenanteil in der Lösung wird, umso höher ist die Nitritkonzentration.

Neben der Zersetzung organischer Moleküle könnten durch Elektrolyse auch Gase wie Wasserstoff, Sauerstoff und Chlor entstehen. Die Bildung von Gasblasen an der Elektrodenoberfläche konnte jedoch in keinem Fall beobachtet werden. Verbunden mit der kathodischen Bildung von Wasserstoff ist eine Zunahme der Hydroxidionen-Konzentration. Je nach Pufferkapazität des Mediums könnte das zu einer kathodischen Erhöhung und anodischen Erniedrigung des pH-Werts führen. Daher wurden die Medium-pH-Werte unmittelbar nach der 30minütigen Befeldung gemessen. Diese Messungen sind jedoch nicht so exakt, da das zur Verfügung stehende Probenvolumen in einer 96well-Platte begrenzt ist. Die pH-Differenzen bei verschiedenen Frequenzen waren jedoch alle gering ( $< 0.05$ ) und sowohl negativ als auch positiv in Bezug auf den Ausgangswert, so dass kein methodischer pH-Effekt zu erkennen war. Es wurde nur in einem Fall eine pH-Änderung von mehr als 0.1 gemessen. Diese Ausnahme – 0.15 Hz bipolarer Puls – verursachte aufgrund ihrer langen Gleichspannungszeit und der asymmetrischen Ladungsbalance auch die größten Nitriteffekte.

Schließlich wurden die Ergebnisse einer nichtparametrischen Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau unterzogen. Diese lieferte nur im Fall von Medium (DMEM) und Puffer mit Arginin/Glukose einen

Zusammenhang zwischen der Gleichspannungsdauer und der Nitritkonzentration auf dem Signifikanzniveau von 0.05. Ein Zusammenhang zwischen der Gleichspannungsdauer und pH-Änderung konnte nicht gefunden werden.

### 5.3 Die Konzentration der zyklischen Nukleotide

Die Konzentration von cAMP unmittelbar nach der Stimulation durch hochfrequente elektrische Felder verhält sich in den beiden untersuchten Zelltypen sehr unterschiedlich, eine Übereinstimmung findet sich nur im mittleren Frequenzbereich. Bei Osteosarcomazellen erfolgt außer bei einer Frequenz von 20 kHz im gesamten Frequenzbereich eine Erhöhung, die an den beiden Enden des betrachteten Bereichs am größten ist. Primäre Osteoblasten reagieren nur bei ausgewählten Frequenzen mit einer minimalen Erhöhung der cAMP- Konzentration, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Ein Unterschied in der Wirkung reiner Sinusfelder und amplitudenmodulierter Sinusfelder (AM) konnte nicht festgestellt werden.

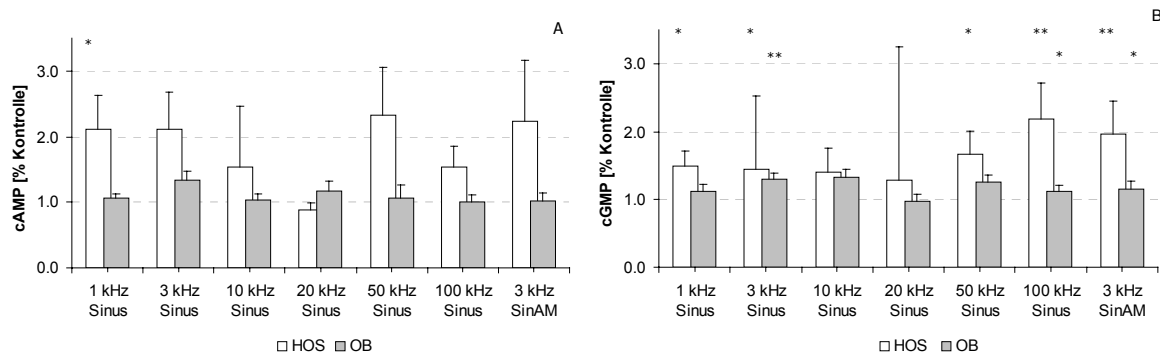


Abb. 5-34 Relative Konzentration von cAMP (A, HOS TE85 (n=8) und primäre Osteoblasten (n=20)) und cGMP (B, HOS TE85 (n=10) und primäre Osteoblasten (n=36)) in Zellpopulationen unmittelbar nach Stimulation durch hochfrequente Sinusfelder. Die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) ist angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Die intrazelluläre cGMP- Konzentration scheint einer der empfindlichsten Parameter für die elektrische Stimulation von Zellen zu sein. Wie schon in der cAMP- Konzentration zeigen HOS-Zellen einen stärkeren Effekt als Osteoblasten. Mit Ausnahme des mittleren Frequenzbereichs erfolgt wieder eine Erhöhung der Konzentration im gesamten Frequenzbereich. Diese ist für HOS-Zellen im oberen Frequenzbereich maximal.

### 5.4 Die Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub>

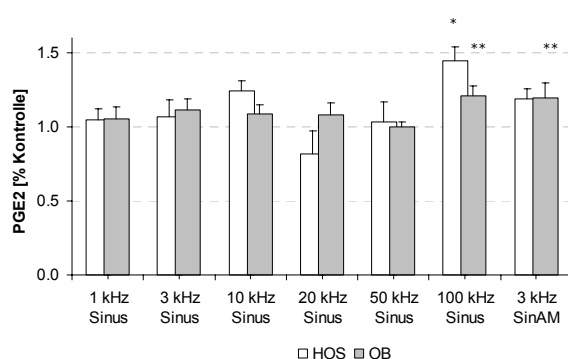


Abb. 5-35 Relative Konzentration von PGE<sub>2</sub> in Populationen von HOS-Zellen (n=20) und primären Osteoblasten (n=16) 6 h nach Stimulation durch hochfrequente Sinusfelder. Die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) ist angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Die Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Medium wurde 6h nach der elektrischen Stimulation gemessen. Osteoblasten zeigen über den ganzen Frequenzbereich ein relativ gleichmäßiges Verhalten, das durch eine geringe Stimulation der PGE<sub>2</sub>- Synthese gekennzeichnet ist. Bei HOS-Zellen ist die PGE<sub>2</sub>- Konzentration ungleichmäßig über den Frequenzbereich verteilt. Mit Ausnahme

von 20 kHz findet aber auch hier eine Nettostimulation statt. Besonders deutlich ist dieser Effekt in beiden Zelltypen für 100 kHz und für amplitudenmodulierte 3 kHz.

## 5.5 Die Translokation der Mitogen-aktivierten Proteinkinase

Ein wichtiger Aspekt für die Untersuchung des MAPK-Signalwegs ist die subzelluläre Lokalisation der Proteinkinase. Da die MAPK ein Verteilungsaktivator ist, liegt sie sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma in aktiver und inaktiver Form vor. Der verwendete Antikörper bindet jedoch nur an die aktive Form. Normalerweise pendelt diese räumlich zwischen Kern und Plasma. Durch die Erfassung der Translokation in den Zellkern, kann man allgemeine Aussagen über Veränderungen der Genexpression machen.

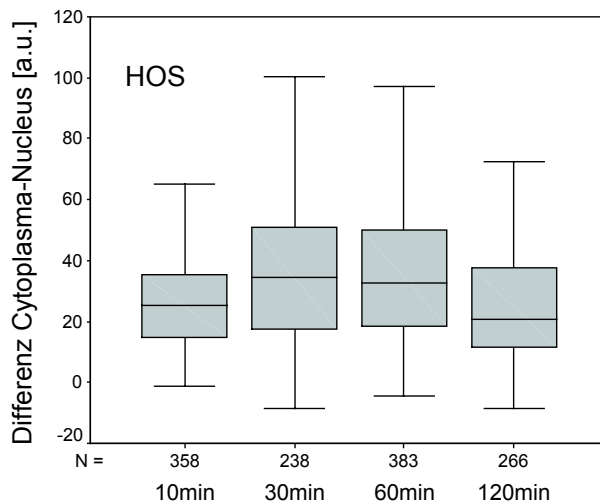


Abb. 5-36 Zeitliches Verhalten der MAPK-Translokation in HOS TE85 nach Befeldung mit 3 kHz (Sinus, 16 Hz amplitudenmoduliert) für 10 bzw. 30 min, angegeben in Fluoreszenzeinheiten. Die Zellzahlen in jeder Versuchgruppe sind angegeben.

Da mit dieser Methode Fluoreszenzintensitäten auf Einzelzellniveau gemessen wurden und die Präparation sehr zeitaufwendig ist, wurden nur ausgewählte Frequenzen bzw. Wellenformen eingesetzt. Besonders aufschlussreich erschienen die bereits verwendeten Rechteckpulse 1.5 Hz, ein sinusförmiges Feld von 16 Hz und 3 kHz sowie ein mit 16 Hz amplitudenmoduliertes Sinusfeld von 3 kHz. Außerdem wurden PMA-stimulierte Kontrollen mitgeführt.

Die ERK-Translokation kann durch die Differenz zwischen zytoplasmatischer und nuklearer Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die quantitative Auswertung erfolgte, indem von den Fluoreszenzbildern mit dem DNA-Farbstoff Hoechst eine Kernmaske erstellt und durch die

dazugehörigen Schwerpunkte horizontale und vertikale Schnitte gemacht wurden. Ausgehend von den Koordinaten des Schwerpunkts wurden die erhaltenen Graustufenprofile mit einem Algorithmus, der nach Plateaus und Intensitätssprüngen sucht, bearbeitet. Die Ergebnisse wurden durch Vergleich der rechtsseitigen und linksseitigen Ergebnisse sowie Größenfilter auf ihre Zuverlässigkeit überprüft. Zweifelhafte Fälle wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Zunächst wurde das zeitliche Verhalten der MAPK-Aktivierung untersucht (Abb. 5-36). Dazu wurden die Proben 30 Minuten befeldet und nach verschiedenen Zeiten fixiert und gemessen. In der Gruppe 10 min wurde auch nur für diese Zeitdauer befeldet. Anhand der veränderlichen Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen Kern und Plasma wird klar, dass es sich bei der MAPK-Aktivierung um ein transientes Signal handelt. Bereits nach 10 Minuten beginnt die Translokation, erreicht nach 30 Minuten ein Maximum und hat nach 2 Stunden das Ausgangsniveau wieder erreicht. Um den experimentellen Aufwand zu begrenzen wurde daher in den folgenden Versuchsreihen nur für 10 min befeldet und die Zellen sofort im Anschluss fixiert. Man findet die Antikörperfluoreszenz sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Insbesondere die Osteosarcomazellen zeigen eine hohe Grundaktivität. In nicht aktivierten Zellen bildet die MAPK-Fluoreszenz im Zytoplasma eine körnige Struktur, nach Aktivierung erscheint die Fluoreszenz diffus. Außerdem kann die unspezifische Anfärbung von Polysacchariden, die in kleinen Vesikeln im Zytoplasma bzw. außen auf der Zellmembran vorliegen, beobachtet werden. Besonders deutlich sind solche Matrixvesikel in Präparaten von Osteoblasten zu sehen.

In unbehandelten subkonfluenten Kontrollpopulationen von Osteosarcomazellen treten nur geringe Intensitätsunterschiede auf (Abb. 5-37A). Trotzdem gibt es eine „Grundaktivierung“ innerhalb der Population, die mit dem subkonfluenten Status zusammenhängen könnte. Außerdem ist ein deutlicher Anteil von Zellen aktiviert, d.h. zur Mitose stimuliert, was bei einer Krebszelllinie auch zu erwarten ist.



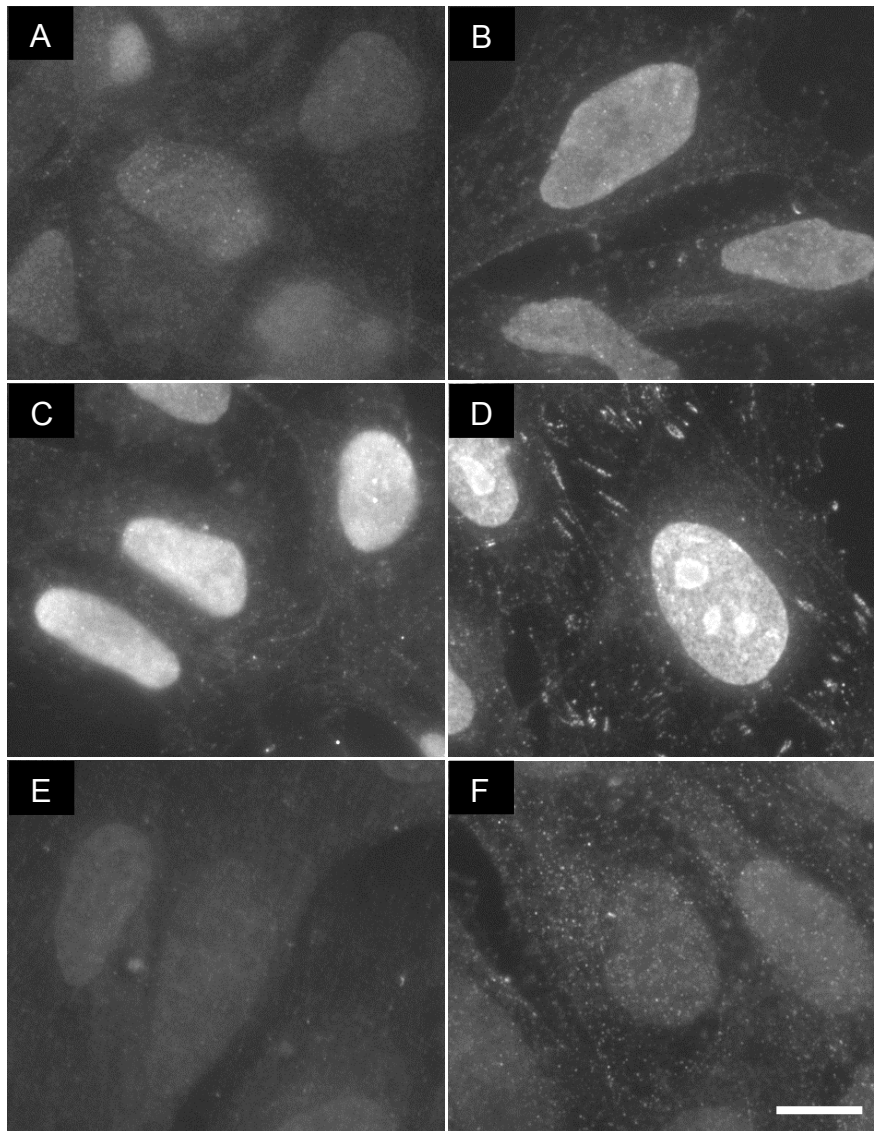


Abb. 5-37 Verteilung der aktivierten MAPK in humanen Osteosarcomazellen. A: Kontrolle, B: Stimulation durch PMA, 30 min, C: Feld 1.5 Hz Rechteckpulse, D: Feld 3 kHz Sinus, E: 16 Hz Sinus, F: 3 kHz Sinus amplitudenmoduliert mit 16 Hz, Balken 10  $\mu$ m.

Entsprechend der relativ hohen Grundaktivierung ist die Wirkung des Mitogens PMA nur begrenzt (Abb. 5-37B). Man erkennt jedoch bei dem Großteil der Zellen eine Umverteilung der Fluoreszenzintensität. Die Bereiche des Zytoplasmas erscheinen dunkler, im Gegensatz dazu beobachtet man im Zellkern und in den kernnahen Regionen eine Anreicherung der MAPK. Diesen positiv stimulierten Kontrollen qualitativ vergleichbar war die Wirkung einer 10 minütigen Befeldung mit entweder niederfrequenten Feldpulsen (Abb. 5-37C, 1.5 Hz) oder hochfrequenten Sinuswellen (Abb. 5-37D, 3 kHz). In beiden Fällen kommt es zu einer deutlichen Aktivierung des Zellkerns durch die Translokation der MAPK. Im Gegensatz zur Anreicherung der MAPK, fanden wir bei Befeldung mit entweder 16 Hz Sinuswellen oder 16 Hz amplitudenmodulierten Sinuswellen von 3 kHz eine Verarmung der MAPK im Zellkern (Abb. 5-37E, F). Trotzdem gibt es auch in diesen Präparaten aktivierte, hell fluoreszierende Zellen, so dass von einer erfolgreichen Bindung der Antikörper ausgegangen werden kann.

In Populationen von primären Osteoblasten tritt eine stärkere, vermutlich unspezifische Anfärbung des Zytoskeletts und matrixhaltiger Vesikel auf. Diese können die Intensitätsunterschiede zwischen Kern und Zytoplasma verschmieren (Abb. 5-38).

In allen untersuchten Präparaten von Osteoblasten fiel der Effekt von Mitogen bzw. Feldapplikation geringer aus als bei Osteosarcomazellen. Im Gegensatz zu den transienten Zellen haben jedoch PMA und alle getesteten Feldformen vergleichbare Wirkungen auf die MAPK-Aktivität. In allen Fällen findet eine Umverteilung der aktivierten MAPK in den Zellkern statt. Geringe Unterschiede finden sich nur in der Art der Ausprägung. Den deutlichsten Effekt zeigen wiederum die Applikation von 3 kHz Sinuswellen und 1.5 Hz Feldpulsen.

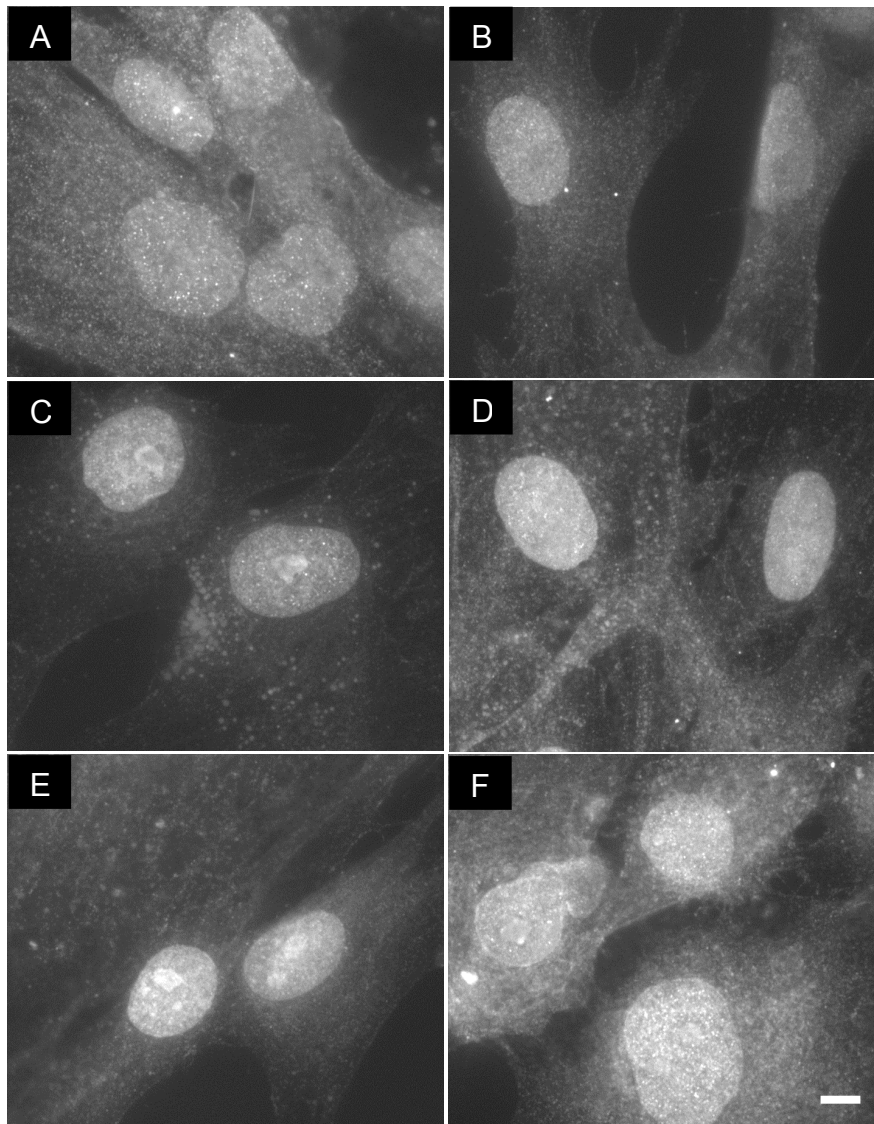


Abb. 5-38 Verteilung der aktivierten MAPK in primären Osteoblasten. A: Kontrolle, B: Stimulation durch PMA, C: Feld 1.5 Hz Rechteckpulse, D: Feld 3 kHz Sinus, E: 16 Hz Sinus, F: 3 kHz Sinus amplitudenmoduliert mit 16 Hz, Balken 10  $\mu$ m.

In Abb. 5-39 sind die Verteilungen der Intensitätsunterschiede, die sich mit der beschriebenen Auswertemethode ergaben, dargestellt. Man erkennt in beiden Zelltypen Verschiebungen der Verteilung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Es war weder eine Abhängigkeit der Aktivierung von der Zelldichte bzw. der Entfernung zu Nachbarzellen, noch von der Zellgröße und Strukturierung nachweisbar. Damit kann nicht von einem Zusammenhang zwischen Zellstatus und Aktivierung ausgegangen werden.

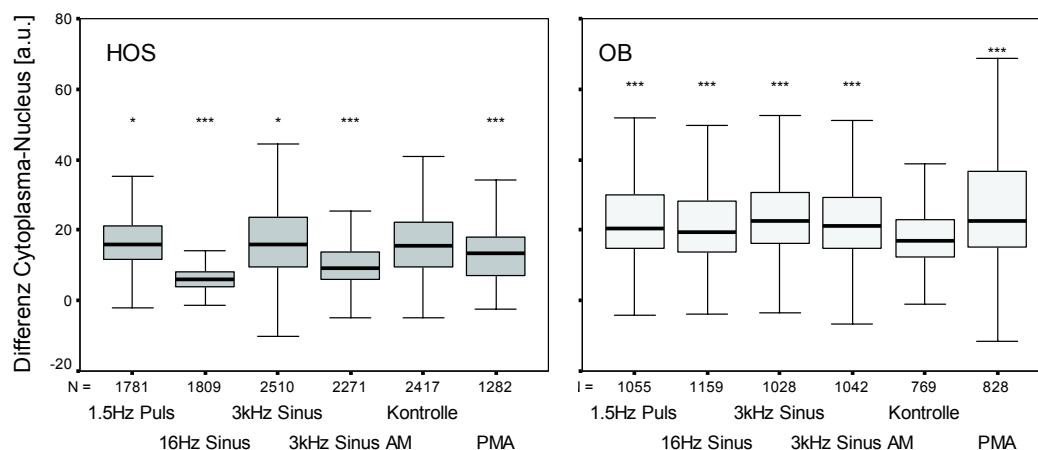


Abb. 5-39 Räumliche Differenz der Fluoreszenzintensität von ERK1/2-Antikörpern zwischen Nukleus und Zytoplasma. Die Zellzahlen in jeder Versuchsgruppe (N) und die asymptotische Signifikanz (2-seitig) für Verteilungsunterschiede (U-Test) sind angegeben mit ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

## 5.6 Die Beeinflussung des Proliferationsverhaltens

Das Proliferationsverhalten der Zellpopulation wurde mit Hilfe von fluorometrischen Messungen des DNA-Gehalts der Proben nach (1), 5, 10 und 15 Tagen in Kultur im Anschluss an die elektrische Stimulation bestimmt. Alle Einzelwerte wurden auf parallel geführte Kontrollversuche normiert.

### 5.6.1 Stimulation von HOS-Zellpopulationen durch niederfrequente Felder

#### 5.6.1.1 Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

Zunächst wurden alle Messparameter an unsynchronisierten Populationen von HOS aufgenommen, was den Verhältnissen *in vivo* entspricht. Anschließend wurden die gleichen Parameter an ausgewählten Zellzuständen gemessen. Dieser Vergleich soll ein besseres Verständnis der Sensibilität und der Rekrutierung einzelner Subpopulationen ermöglichen.

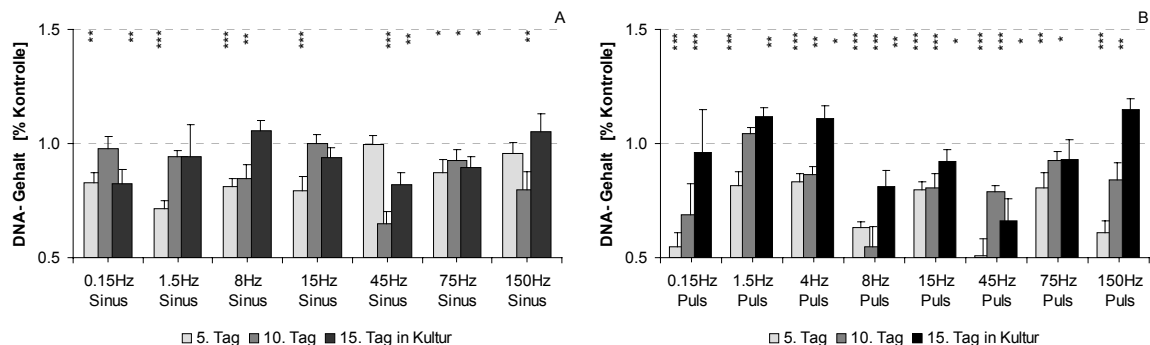


Abb. 5-40 Relativer DNA-Gehalt von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequenten Sinusfeldern (A) und niederfrequent gepulsten Feldern (B). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Sowohl für die gepulsten Felder als auch für die Sinusfelder beobachtet man in den ersten Tagen nach der elektrischen Stimulation (bis etwa zum 5. Tag) in nahezu allen Fällen eine Hemmung der Proliferation. Diese ist jedoch nicht bei allen Frequenzen gleich stark ausgeprägt. Im weiteren Verlauf wird dieser Unterschied zu den Kontrollen zunehmend kompensiert und kann in einzelnen Fällen sogar zu einer Erhöhung der Proliferationsrate gegenüber den Kontrollen führen. Dieses Verhalten lässt sich nur durch einen veränderten Verlauf der Wachstumskurven erklären (Abb. 5-41). Nach einer anfänglichen Hemmung der Proliferation beginnt die log-Phase (exponentielles Wachstum) in den stimulierten Zellen verzögert, verläuft jedoch dafür steiler. Das könnte sich zum einen in einer verkürzten Zyklusdauer manifestieren, oder andererseits bedeuten, dass der Anteil der Zellen, die sich nicht aktiv im Zellteilungszyklus befinden, nämlich die Zellen der  $G_0$ -Phase, kleiner wird. Wenn ein

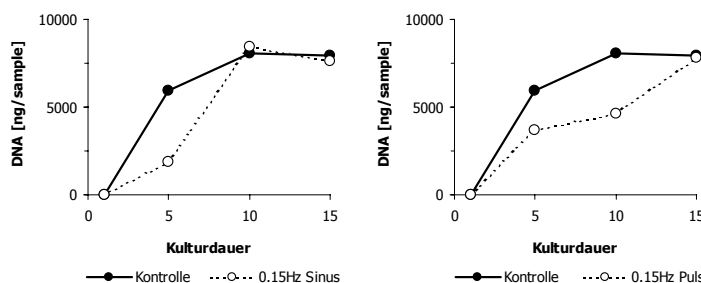


Abb. 5-41 Absoluter DNA-Gehalt von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequenten Sinusfeldern (links) und gepulsten Feldern (rechts).

bei stimulierten Zellen auf, jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten. Das bedeutet aber auch, dass nach Erreichen dieses Plateaus keine Unterschiede zwischen Kontrollen und stimulierten Zellen mehr nachzuweisen sind. Generell verursachen die extrem niedrigen Frequenzen  $< 10$  Hz die stärkste Wirkung. Zudem ist der Effekt monopolarer Pulse größer als der symmetrischer Sinuswellen.

### 5.6.1.2 In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

Werden HOS-Kulturen durch Serumentzug in der G<sub>0</sub>-Phase angereichert und in diesem Zustand stimuliert, treten stärkere Effekte als bei unsynchronisierten Zellen auf. Jedoch ist der Vergleich der Wachstumskurven von Kontrollen und befeldeten Zellen nicht so eindeutig wie dort. Dies äußert sich einerseits darin, dass 10 Tage nach der Stimulation die Zellzahl gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht ist; andererseits kompensieren die Kontrollen im weiteren Kulturverlauf den Wachstumsvorsprung, so dass nach 15 Tagen der Effekt bei einigen Frequenzen wieder verschwunden ist, bei einigen Frequenzen sich aber auch umgekehrt hat. Insbesondere die extrem niedrigen Frequenzen <10 Hz führen sowohl bei gepulsten als auch bei Sinusfeldern zu langanhaltenden Effekten.

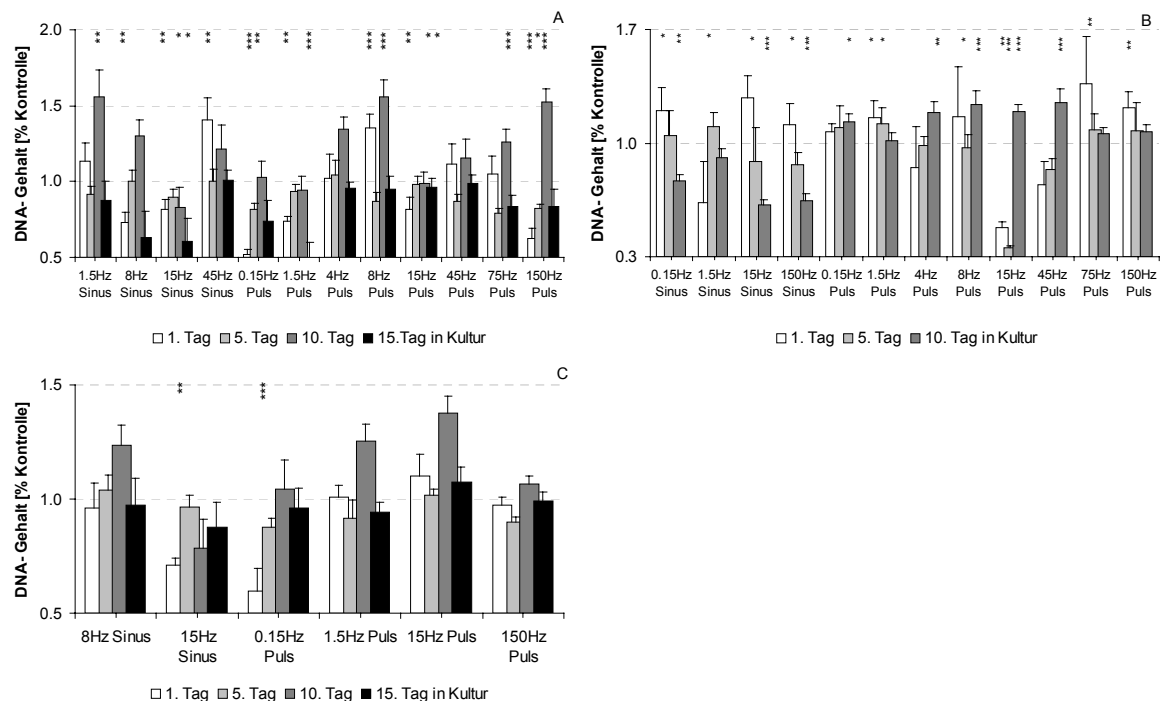


Abb. 5-42 Relativer DNA-Gehalt von HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequent gepulsten Feldern während der G<sub>0</sub>-Phase (A), G<sub>1</sub>-Phase (B) und S-Phase (C). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Die beschriebenen Effekte nehmen noch weiter zu, wenn die Zellkultur für die Stimulation in der späten G<sub>1</sub>-Phase angereichert wird. Wiederum zeigen sich am ersten Kulturtag nach der Stimulation noch im gesamten Frequenzbereich schwache Effekte, die sich bis zum 10. Kulturtag noch verstärken. Fasst man die Ergebnisse der Stimulation in der G<sub>0</sub>- und der G<sub>1</sub>-Phase zusammen, kristallisieren sich drei interessante Bereiche heraus: a) die extrem niedrigen Frequenzen ( $\leq 2$  Hz), b) der Bereich um 15 Hz, c) die höheren Frequenzen (75-150 Hz).

Aus den Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration (Kap. 5.1) konnte geschlossen werden, dass Zellen während der S-Phase besonders sensibel für die elektrische Stimulation sind. Dieses Verhalten konnte durch die Proliferationsmessungen über einen längeren Zeitraum nicht bestätigt werden. Effekte finden sich nur unmittelbar am Tag nach der Stimulation und dann auch nur bei einzelnen Frequenzen. Aber auch hier erweisen sich 15 Hz sowohl bei gepulsten als auch bei Sinusfeldern als bedeutsam. Im weiteren Verlauf der Zellkultivierung kann kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten Zellen und Kontrollen mehr nachgewiesen werden.

### 5.6.1.3 In Gel eingebettete HOS TE85

Die Messungen an dreidimensionalen Strukturen sind gekennzeichnet durch große Streuungen der Einzelwerte. Das erschwert es, signifikante Unterschiede in der Wirkung einzelner Frequenzen herauszufinden. Prinzipiell scheint das Wachstum in diesem System etwas verlangsamt zu sein. Jedoch haben Sinusfelder eine stärkere Wirkung als gepulste Felder.

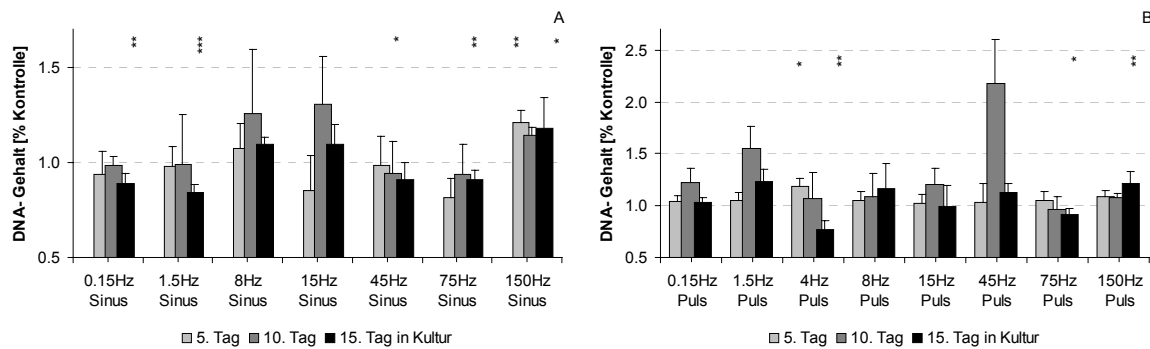


Abb. 5-43 Relativer DNA-Gehalt von HOS TE85 in 3D-Struktur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequenten Sinusfeldern (A) und niederfrequent gepulsten Feldern (B). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

## 5.6.2 Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder

### 5.6.2.1 Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

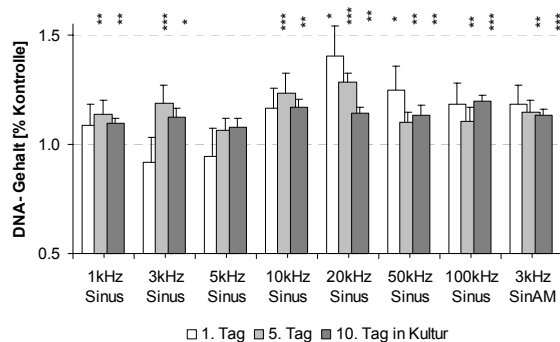


Abb. 5-44 Relativer DNA-Gehalt von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Sinusfeldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Ähnlich wie für die Stimulation durch niederfrequente Felder beobachtet man auch im höheren Frequenzbereich um 3-5 kHz anfänglich eine geringe Wachstumshemmung. Diese ist jedoch nicht signifikant. Während der weiteren Kultivierung wird dieser Unterschied zu den Kontrollen zunehmend kompensiert und führt letztendlich sogar zu einer Erhöhung der Zellzahl gegenüber den Kontrollen. Bei Einsatz noch höherer Frequenzen kommt es von Anfang an zu einer Wachstumssteigerung, die über den gesamten Beobachtungszeitraum anhält. Die absolute Höhe dieses Unterschieds nimmt jedoch durch den bereits oben beschriebenen Verlauf der Wachstumskurven stetig ab. Es muss also auch in diesem Frequenzbereich ein schnelleres Wachstum in den ersten Tagen nach der Stimulation erfolgen. Im Gegensatz zur Wirkung niederfrequenter Felder bleibt jedoch der positive Einfluss auf das Zellwachstum über längere Zeit bestehen. Besonders erwähnenswert scheint das Verhalten im Frequenzbereich 3-5 kHz und 20 kHz. Die Frequenzen oberhalb 20 kHz rufen nahezu identische Wirkungen hervor.

### 5.6.2.2 In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

Die elektrische Stimulation von Osteosarcomazellen während der  $G_0$ -Phase ruft nahezu keine Veränderung im Wachstum der Zellen hervor. Die zudem großen Streuungen der Einzelwerte lassen keine Aussagen über eine frequenzabhängige Wirkung zu. Ähnlich der Feldwirkung während der  $G_0$ -Phase bewirkt die Stimulation während der späten  $G_1$ -Phase eine nur geringe Erhöhung der Proliferation, die jedoch gegenüber den Kontrollen verzögert einsetzt. Diese ist außerdem nur in einem Fall signifikant. Auch eine Stimulation während der S-Phase kann keine höheren Proliferationseffekte erzielen. Man beobachtet zwar eine geringfügige Erhöhung des Zellwachstums, die jedoch kaum signifikant ist. Im Gegensatz zur Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder während

der frühen Phasen des Zellzyklus ( $G_0$ ,  $G_1$ , S), wird die Proliferation bei Stimulation während der  $G_2$ -Phase kurzfristig, jedoch nur im unteren Frequenzbereich von 1-10 kHz.

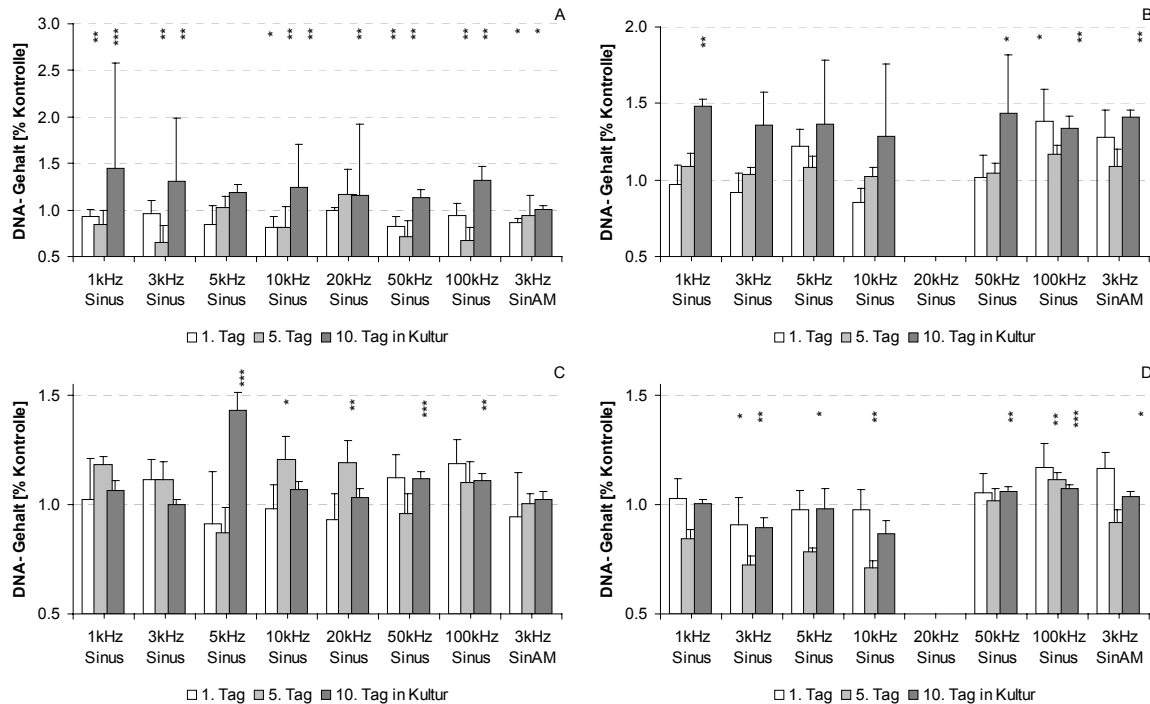


Abb. 5-45 Relativer DNA-Gehalt von HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Sinusfeldern während der  $G_0$ -Phase,  $G_1$ -Phase, S-Phase und  $G_2$ -Phase. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

### 5.6.2.3 In Gel eingebettete HOS TE85

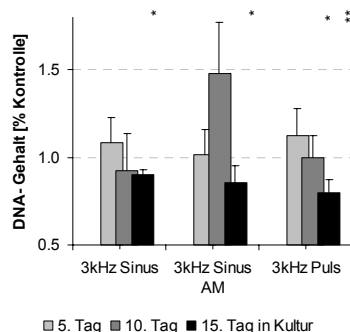


Abb. 5-46 Relativer DNA-Gehalt von HOS TE85 in 3D-Struktur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Feldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Bei der Applikation von hochfrequenten Feldern in eine 3D-Kultur von HOS TE85 wird im Gegensatz zu den oben beschriebenen 2D-Kulturen die Proliferation der eingebetteten Zellen gehemmt. Das entspricht in der Art der Wirkung eher dem Effekt niederfrequenter Felder.

### 5.6.2.4 Primäre Osteoblasten in 2D- und 3D-Kultur

Auch bei primären Osteoblasten bewirkt die Applikation hochfrequenter Felder eine Erhöhung der Wachstumsrate. Diese ist schon früh, d.h. bereits am ersten Tag nach Befeldung zu beobachten. Mit zunehmender Kulturdauer nimmt jedoch der Unterschied zu den Kontrollen ab und ist nach 10 Tagen vollständig verschwunden.

Im Gegensatz zum Wachstumsverhalten von Zellen in Monolayerkultur, ruft die Stimulierung von Osteoblasten in einer 3D-Struktur eine Proliferationshemmung hervor. Dieser Effekt wurde sonst nur bei der Applikation niederfrequenter Felder beobachtet. Innerhalb von 10 Tagen nach der Stimulation wird der Wachstumsvorsprung der Kontrollen aber aufgeholt.

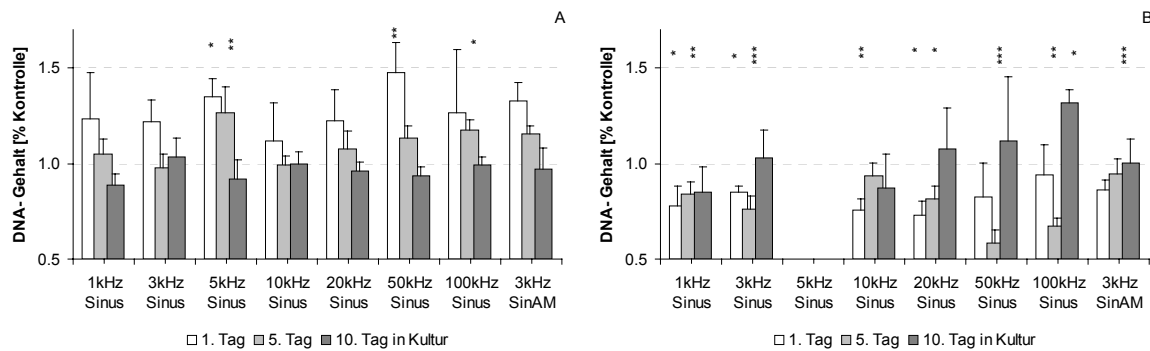


Abb. 5-47 Relativer DNA-Gehalt von primären Osteoblasten in Monolayerkultur (A) und in 3D-Struktur (B) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Feldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

### 5.6.2.5 Stimulation von L929 Fibroblasten

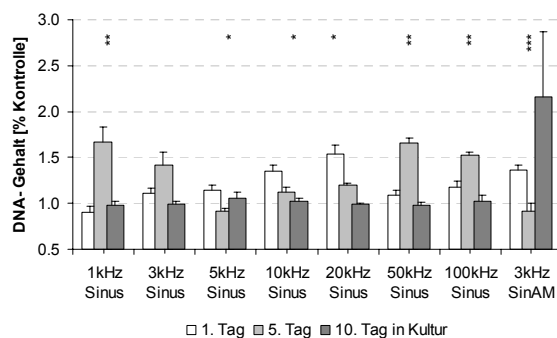


Abb. 5-48 Relativer DNA-Gehalt von L929 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Feldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Die Applikation hochfrequenter elektrischer Felder führt auch bei der Fibroblastenlinie L929 zu gesteigertem Zellwachstum. Damit stimmt das Verhalten dieser Zellen mit dem der beiden Knochenzellen überein. Die beobachteten Effekte sind jedoch mit einer geringeren Signifikanz ausgezeichnet. Einzige Ausnahme bildet die Gruppe 3 kHz Sinus AM. Offenbar bewirkt der Einsatz eines niederfrequent modulierten Feldes bei L929 einen längerfristigen Effekt.

### 5.6.3 Behandlung von HOS TE85 mit konditioniertem Medium

In der folgenden Versuchsreihe werden die Zellen im Gegensatz zu den bisher dargestellten Experimenten lediglich mit im zellfreien System befeldeten Medium versorgt. D.h. die Zellen erfahren selbst kein elektrisches Feld, sind aber den elektrolytisch bedingten Veränderungen im Zellkulturmedium ausgesetzt. Dieses Vorgehen soll es ermöglichen, den Einfluss langlebiger Elektrolyseprodukte deutlich zu machen und die Wirkung von elektrischem Feld und elektrochemischer Prozesse zu differenzieren.

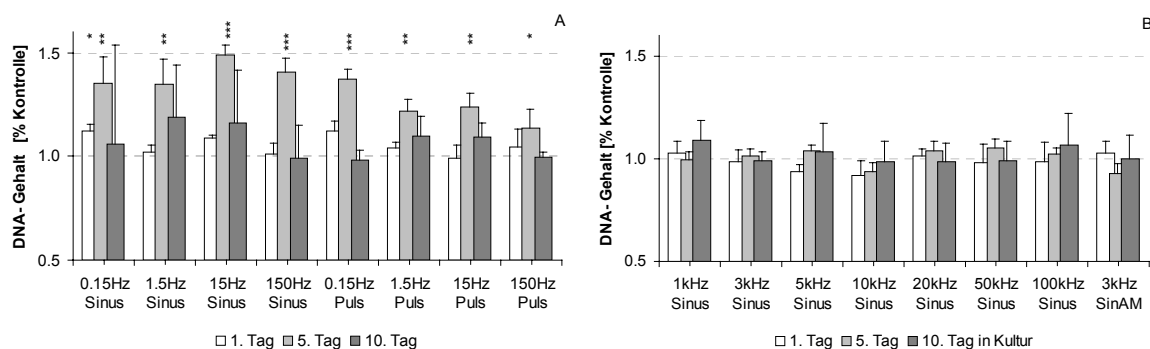


Abb. 5-49 Relativer DNA-Gehalt von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit niederfrequent bzw. hochfrequent konditioniertem Medium. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Abb. 5-49 zeigt, dass durch die Kultivierung in konditioniertem Medium das Wachstum von HOS TE85 beschleunigt wird. Dieser Effekt ist nach 5 Tage in Kultur am stärksten ausgeprägt und verschwindet im weiteren Beobachtungszeitraum. Außerdem wird erkennbar, dass der Effekt bei den kleinsten Frequenzen maximal ist und zudem im Fall von Sinusfeldern stärker als bei kurzen Rechteckpulsen. Das weist klar auf einen Zusammenhang zwischen proliferationssteigernder Wirkung und der ins Medium übertragenen Ladungsmenge hin.

Besonders interessant ist der Vergleich mit den Ergebnissen direkt befeldeter Zellen (Abb. 5-40). Während dort elektrisches Feld und Redoxprozesse im Medium zusammen zu einer Hemmung der Proliferation führen, bewirken die Veränderungen im Medium allein eine Erhöhung der Wachstumsrate.

Die Kultivierung von HOS TE85 in hochfrequent konditioniertem Medium hat kein verändertes Wachstum zur Folge. Das stimmt mit der Erfahrung überein, dass Elektrolyseprozesse bei Frequenzen oberhalb 1 kHz vernachlässigt werden können. Damit liefert diese Versuchsreihe einen wichtigen Hinweis darauf, dass es sich bei der oben (5.6.2.1) beschriebenen proliferationssteigernden Wirkung wirklich um Feldeffekte handelt.

## 5.7 Die Beeinflussung der ALP-Aktivität

### 5.7.1 Stimulation von HOS- Zellpopulationen durch niederfrequente Felder

#### 5.7.1.1 Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

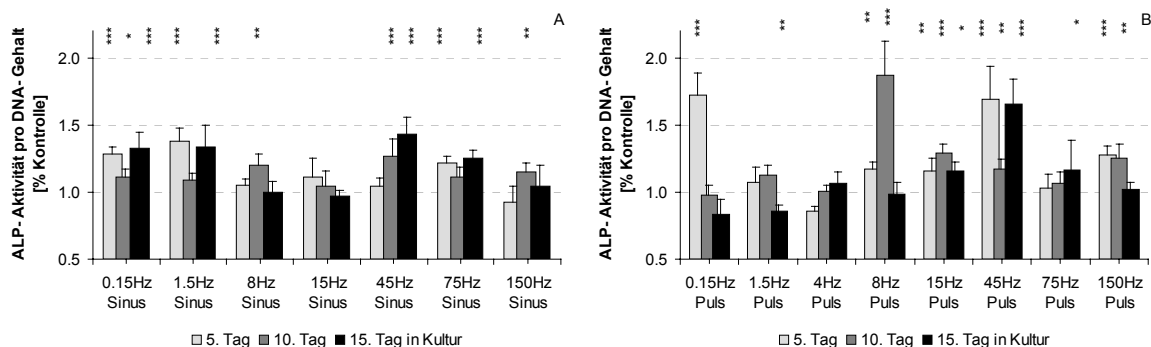


Abb. 5-50 Relative ALP-Aktivität von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequenten Sinusfeldern(A) und niederfrequent gepulsten Feldern (B). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Der Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) verhält sich invers zu ihrer Wirkung auf das Proliferationsverhalten von HOS-Kulturen. Im Fall von Feldpulsen kann zwischen den Tagen 5 und 10 nach der Stimulation eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Diese ist jedoch bei den meisten Frequenzen nicht andauernd und verschwindet bis zum 15. Tag. Insbesondere bei 75 Hz ist die ALP-Aktivität anhaltend erhöht, im Gegensatz dazu wird sie durch den Einsatz extrem niedriger Frequenzen sogar herabgesetzt.

Erfolgt die Stimulation durch Sinusfelder, beobachtet man eine andauernde Erhöhung der ALP-Aktivität.

#### 5.7.1.2 In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

Werden in der  $G_0$ -Phase angereicherte HOS-Populationen durch niederfrequente elektrische Felder stimuliert, sind nur in sehr wenigen Gruppen deutliche Unterschiede in der ALP-Aktivität zu vermerken. Jedoch sind die Streuungen der Einzelwerte sehr hoch, so dass ein geringer Einfluss prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann.



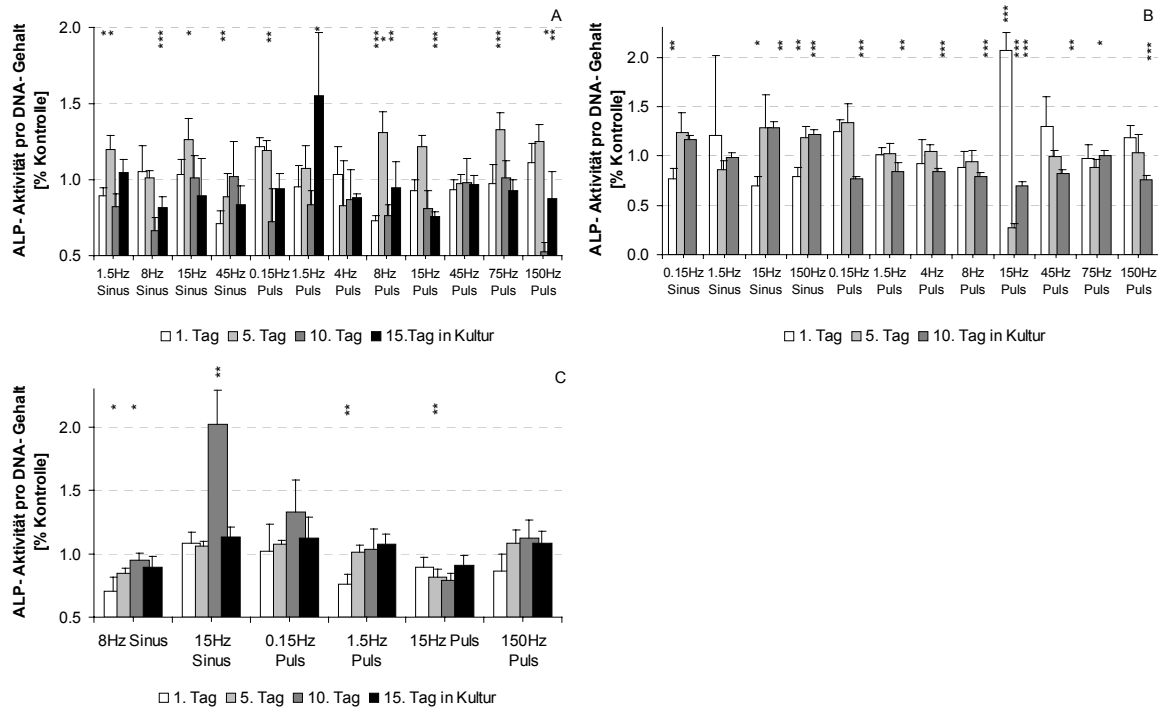


Abb. 5-51 Relative ALP-Aktivität von HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequent gepulsten Feldern während der G<sub>0</sub>-Phase (A), G<sub>1</sub>-Phase (B) und S-Phase (C). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben (p<0.001 \*\*\*, p<0.01 \*\*, p<0.05 \*).

Die elektrische Stimulation von Zellen während der späten G<sub>1</sub>-Phase liefert in den ersten Tagen ein ähnliches Ergebnis wie die Stimulation von Zellen der G<sub>0</sub>-Phase. Es können nur sehr geringe Unterschiede zu den Kontrollen beobachtet werden. Am 10. Tag wird dann ein qualitativer Unterschied in der Wirkung von gepulsten und Sinusfeldern deutlich. Während unipolar gepulste Felder eine Nettoladung übertragen und letztendlich die ALP-Aktivität der Zellen herabsetzen, bewirken ausgeglichene Ladungsverhältnisse wie sie bei Sinusfeldern auftreten eher eine Erhöhung der Enzymaktivität.

Ebenso wie die Proliferation kann auch die Enzymaktivität von HOS-Zellen, die während der S-Phase stimuliert werden, nur kurzfristig verändert werden. Anfangs beobachtet man eine verminderte ALP-Aktivität gegenüber den Kontrollen, die jedoch sehr schnell kompensiert wird.

### 5.7.1.3 In Gel eingebettete HOS TE85

In 3D-Strukturen von HOS-Zellen sind nur kurzfristige Effekte der elektrischen Stimulation auf die Enzymaktivität nachweisbar. Die Streuungen der Einzelwerte sind aber in diesen Proben sehr groß, so dass die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen selten signifikant sind. Jedoch scheinen die gepulsten Felder einen stärkeren Effekt als Sinusfelder zu haben.

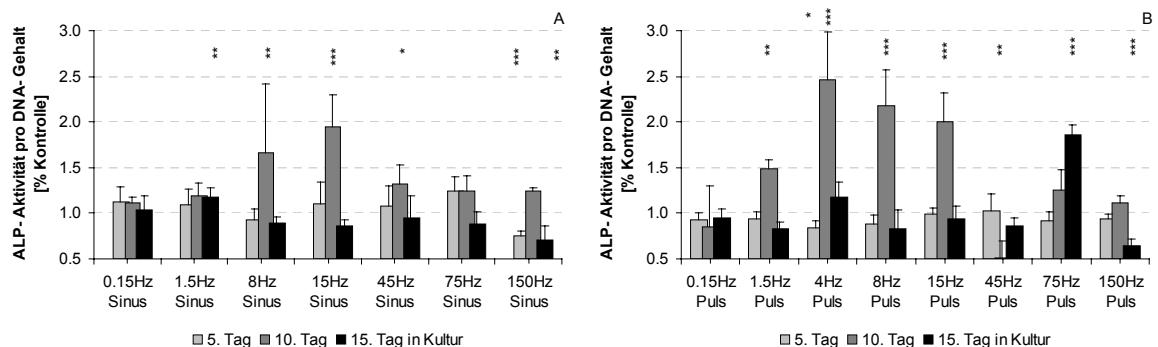


Abb. 5-52 Relative ALP-Aktivität von HOS TE85 in 3D-Struktur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequenten Sinusfeldern (A) und niederfrequent gepulsten Feldern (B). Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben (p<0.001 \*\*\*, p<0.01 \*\*, p<0.05 \*).

## 5.7.2 Stimulation von Zellpopulationen durch hochfrequente Wechselfelder

### 5.7.2.1 Unsynchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

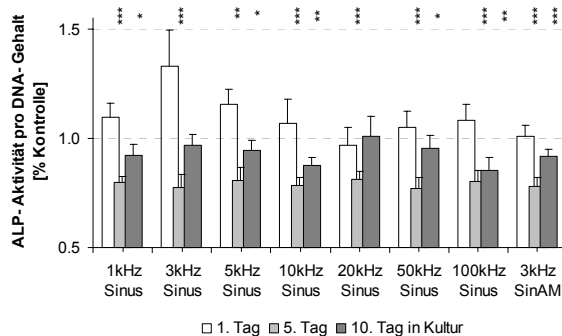


Abb. 5-53 Relative ALP-Aktivität von unsynchronisierten HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation hochfrequenter Sinusfelder. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Die ALP-Aktivität der HOS-Zellen wird durch die Applikation hochfrequenter Felder nach einer anfänglichen Erhöhung geringfügig gehemmt. Letztendlich bedeutet das ein verzögertes Einsetzen von Differenzierung und Mineralisation.

### 5.7.2.2 In spezifischen Zyklusphasen synchronisierte Zellpopulationen von HOS TE85

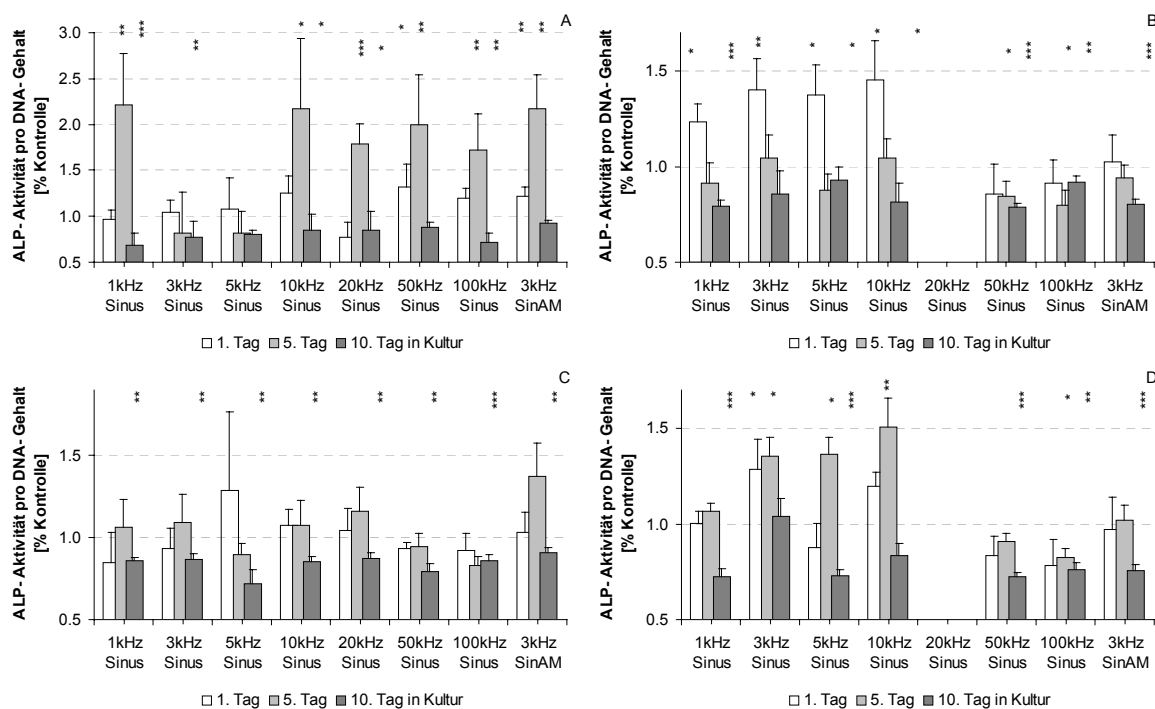


Abb. 5-54 Relative ALP-Aktivität von HOS TE85 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von niederfrequent gepulsten Feldern während der G<sub>0</sub>-Phase, G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Ähnlich wie bei der Proliferation kann auch die ALP-Aktivität von Zellen, die während der G<sub>0</sub>-Phase stimuliert wurden, nicht dauerhaft verändert werden. Am wahrscheinlichsten ist eine stimulierende Wirkung durch Frequenzen  $> 10$  kHz. Werden HOS-Zellen während der späten G<sub>1</sub>-Phase elektrisch stimuliert, beobachtet man zunächst eine gegenüber den Kontrollen erhöhte ALP-Aktivität. Diese hängt mit einer geringfügigen Wachstumshemmung. Dieser Anfangseffekt wird aber in den folgenden Tagen von den Kontrollen kompensiert und führt eher zu einer gegenüber den Kontrollen verminderten Enzymaktivität. Signifikant ist der Unterschied jedoch nur an den beiden Enden des untersuchten Frequenzbereichs. Ebenso wie die Stimulation während der G<sub>1</sub>-Phase resultiert die Stimulation in der S-Phase in einer herabgesetzten ALP-Aktivität. Die Höhe dieses Effekts fällt jedoch

geringer aus und 10 Tage nach Stimulation kann bei keiner Frequenz ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden. Die Stimulation während der G<sub>2</sub>-Phase ruft den größten Effekt an synchronisierten Zellen hervor. Qualitativ ist der Einfluss auf die ALP-Aktivität vergleichbar mit dem Ergebnis in den anderen Zellzyklusphasen.

### 5.7.2.3 In Gel eingebettete HOS TE85

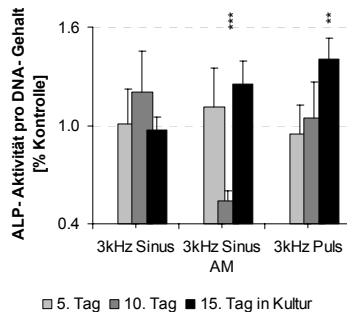


Abb. 5-55 Relative ALP-Aktivität von HOS TE85 in 3D-Struktur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Feldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Auch an HOS-Zellen in 3D-Kultur kann man nach elektrischer Stimulation einen dem Verhalten von Monolayerkulturen entgegengesetzten Effekt auf die ALP-Aktivität beobachten. Die Enzymaktivität wird leicht erhöht, was aber nur im Fall von gepulstem Feld statistisch signifikant ist.

### 5.7.2.4 Primäre Osteoblasten in 2D- und 3D-Kultur

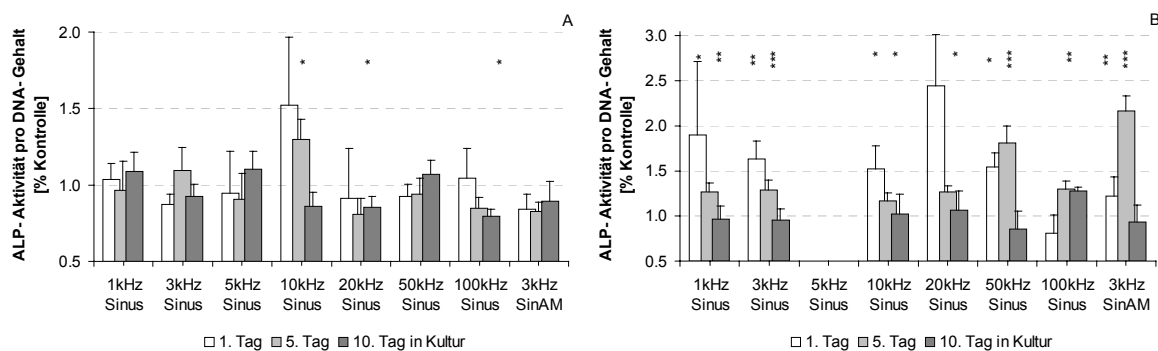


Abb. 5-56 Relative ALP-Aktivität von primären Osteoblasten in Monolayerkultur (A) und in 3D-Struktur (B) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von hochfrequenten Feldern. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Nach der Applikation von elektrischen Feldern auf Kulturen von primären Osteoblasten können nur geringfügige Beeinflussungen der ALP-Aktivität festgestellt werden. Mit Ausnahme der Gruppe 10 kHz wurde im gesamten Frequenzbereich tendenziell eine Herabsetzung der Enzymaktivität beobachtet. Diese sind jedoch nur zwischen 10 kHz und 20 kHz und bei 100 kHz signifikant. Die ALP-Aktivität von Osteoblasten in 3D-Struktur lässt sich durch die Applikation elektrischer Felder nur gering beeinflussen. Nach anfänglicher Erhöhung gegenüber der Kontrolle sinkt die relative Enzymaktivität wieder und ist 10 Tage nach der Stimulation nicht statistisch signifikant.

### 5.7.3 Behandlung von HOS TE85 mit konditioniertem Medium

Wie auch schon bei der Beeinflussung der Proliferation bewirkt die alleinige Behandlung mit konditioniertem Medium einen ganz anderen Effekt als die direkte Feldapplikation. Die Befeldung der Zellen (Abb. 5-50) hatte zur Folge, dass sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase gegenüber den Kontrollen erhöhte. Kommen die Zellen jedoch nur mit befeldetem Medium in Berührung, treten nur bei den niedrigsten Frequenzen Effekte in der Enzymaktivität auf. Diese wird durch die Veränderungen im Medium allerdings herabgesetzt und korrespondiert so mit dem stärkeren Wachstum in dieser Versuchsgruppe.

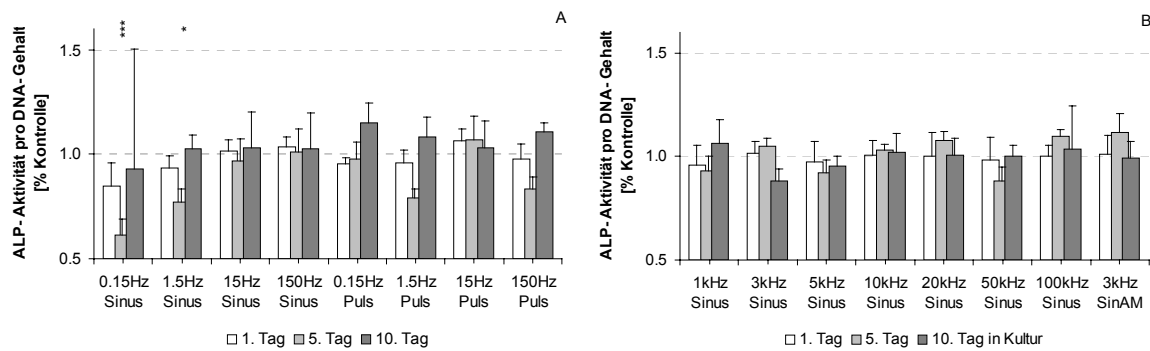


Abb. 5-57 Relative ALP-Aktivität von HOS TE85 nach Behandlung mit niederfrequent (A) bzw. hochfrequent (B) konditioniertem Medium. Die Signifikanzen für Verteilungsunterschiede (U-Test) an jedem Messtag sind angegeben ( $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*).

Neben dem fehlenden Einfluss auf das Zellwachstum hat die Kultivierung von HOS TE85 in hochfrequent konditioniertem Medium auch keine signifikante Wirkung auf die ALP-Aktivität der Zellen. Bei den verwendeten Frequenzen ist von einer elektrolytischen Veränderung des Zellkulturmediums aber auch nicht auszugehen.

## 5.8 Korrelation von Feldwirkung und Frequenz

In den dargestellten Experimenten wurde die Beeinflussung von Knochenzellen durch elektrische Felder in einem weiten Frequenzbereich untersucht. Im Mittelpunkt stand die Erfassung des Verhaltens von Wachstum und Differenzierung über die zeitabhängige Messung von DNA-Gehalt und ALP-Aktivität. Beide Parameter sind mit der Stimulationsfrequenz korreliert (Abb. 5-58), wobei der Effekt zwischen dem 5. und 10. Tag nach der Feldapplikation maximal ist. Für die Proliferation ergibt sich am 5. Tag ein Korrelationskoeffizient von 0.65 bzw. 0.63 für die ALP-Aktivität. Diese Werte sind auf dem Niveau von 0.01 signifikant. Bei niedrigen Frequenzen findet eine Wachstumshemmung statt, gleichzeitig ist die ALP-Aktivität erhöht. Im hochfrequenten Bereich beobachtet man das entgegengesetzte Verhalten. Der Umkehrpunkt, d.h. der Bereich in dem kein Effekt ausgelöst wird, liegt zwischen 100 Hz und 1 kHz. Einzelne herausragende Frequenzen bzw. Fenstereffekte waren nicht nachweisbar.

Bei längerer Kultivierung werden die beobachteten Unterschiede zu den Kontrollen zunehmend kompensiert und sind dann nicht mehr signifikant. Die naheliegendste Erklärung dafür ist eine Veränderung der Wachstumskurven von stimulierten Zellen.

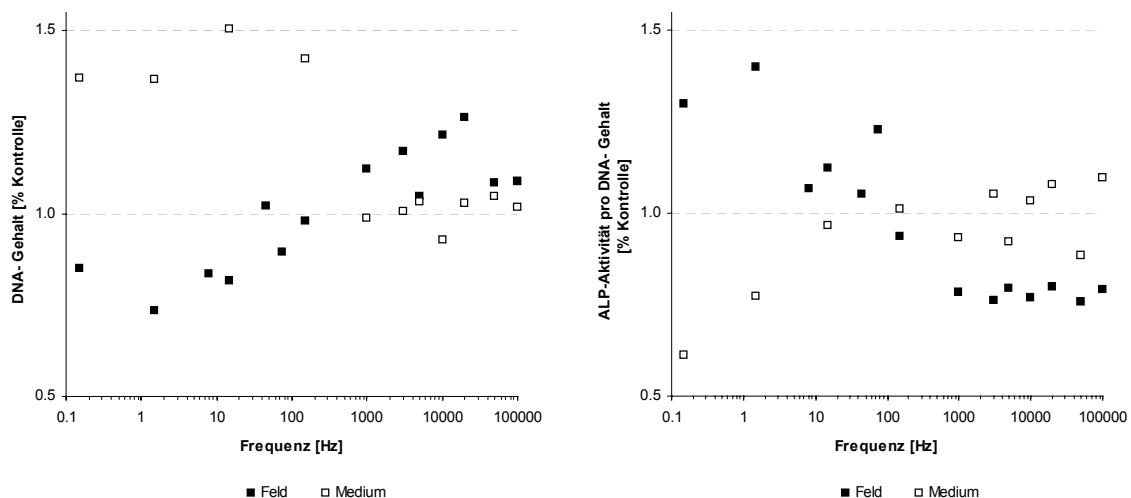


Abb. 5-58 Zusammenhang zwischen Proliferation (links) bzw. ALP-Aktivität (rechts) und Frequenz der elektrischen Stimulation 5 Tage nach Befeldung.

Im Vergleich zu diesen direkt befeldeten Zellen ist das Verhalten von Zellen, die ausschließlich mit befeldetem Medium in Kontakt waren, besonders interessant. Hier hebt sich ganz klar der Frequenzbereich oberhalb 1 kHz heraus, in dem weder auf die Proliferation noch auf die

Differenzierung von HOS-Zellen eine Wirkung zu verzeichnen ist. Diese Schwelle stimmt sehr gut mit der oben beschriebenen „Nullstelle“ für die Feldwirkung überein und entspricht außerdem der Frequenz, oberhalb derer erwartungsgemäß keine Elektrolyseprodukte mehr im Medium nachweisbar sind. Im unteren Frequenzbereich verursachen jedoch die chemischen Veränderungen im Medium, welche die direkte Folge des elektrischen Stroms sind, einen der Feldwirkung entgegengesetzten Effekt.

Das spricht zum einen dafür, dass die Produkte der an den Elektroden ablaufenden Reaktionen selbst in der Lage sind, das Verhalten der untersuchten Zellen zu beeinflussen. Andererseits zeigt die gegensätzliche Wirkung von elektrischem Feld und Elektrolyseprodukten, dass es sich bei den beschriebenen Ergebnissen wirklich um feldbedingte Effekte und nicht nur um methodisch verursachte Nebenwirkungen handelt.

Diese Vermutung lag nahe, da auch die Konzentrationen von Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der Stimulationsfrequenz korreliert sind (Abb. 5-59). Auch hier liegt der Nulldurchgang ungefähr bei 100 Hz. Das Signifikanzniveau für die Korrelation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der Frequenz beträgt 0.01, für die Korrelation von Nitrit und Frequenz bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Nitrit beträgt es 0.05.

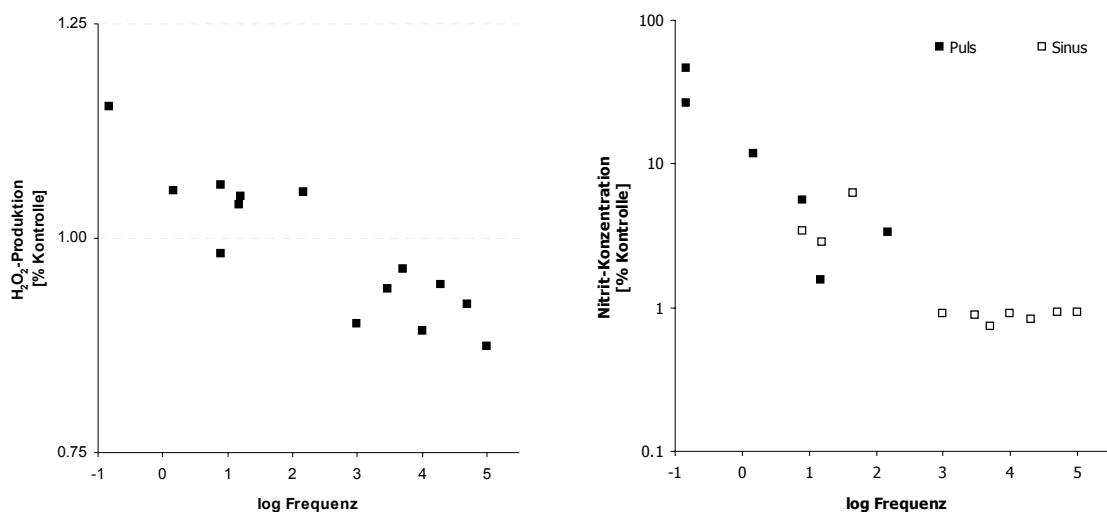


Abb. 5-59 Frequenzabhängigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion (links) und der Nitritkonzentration (rechts) nach direkt eingekoppelter elektrischer Stimulation.

Im niederfrequenten Bereich müssen daher unbedingt die Artefakte der elektrischen Stimulation durch faradayschen Stromfluss berücksichtigt werden. Elektrolyse von organischen Mediumkomponenten und nachfolgende Redoxreaktionen können zu einer Erhöhung des Nitritgehalts der Proben führen. Dieser Effekt ist zellunabhängig und lediglich von den elektrochemischen Eigenschaften des Systems bestimmt. Ladungsbalancierte Wellenformen können diesen Effekt begrenzen, sind jedoch keine Garantie dafür, dass die Redoxreaktionen reversibel ablaufen. Es besteht daher die Gefahr, dass es besonders in Protein bzw. Aminosäure enthaltenden Medien zu einer Anhäufung von Stickoxiden und anderer hoch reaktiver Verbindungen kommt. Eine gleichzeitige Verschiebung des pH-Werts konnte nicht festgestellt werden. Das liegt sicher an der hohen Pufferkapazität biologischer Medien, die zumindest bei kurzzeitiger Stimulation eine pH-Veränderung verhindert.

## 5.9 Zusammenfassung der zellbiologischen Ergebnisse

Für die Beurteilung eines Nettoeffekts, der sich aus dem Verhalten aller Einzelparameter zusammensetzt, sollte man Tab. 5-1 heranziehen. Diese fasst die Feldeffekte über alle gemessenen Parameter zusammen.

Für den Frequenzbereich über 1 kHz findet man immer eine Erhöhung des Wachstums und der Konzentration der „second messenger“ und einen verzögerten Anstieg der ALP-Aktivität bzw. eine Herabsetzung der Nitrit- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. Die Frequenzbereiche, in denen man besonders hohe bzw. niedrige Feldeffekte findet, stimmen für alle Parameter ungefähr überein. Besonders die Bereiche 3-5 kHz und 20 kHz heben sich von den anderen Frequenzen ab. Zu erwähnen ist auch der

größere Effekt von amplitudenmodulierten Sinusfeldern im Vergleich zu reinen Sinusfeldern. Die Signalwege, die cAMP und PGE<sub>2</sub> benutzen, scheinen bei der Stimulation durch hohe Frequenzen keine deutliche Rolle zu spielen. Von einer Beteiligung von cGMP ist jedoch auszugehen.

Tab. 5-1 Zusammenfassung der signifikanten Veränderungen in verschiedenen Messparametern unter dem Einfluss elektrischer Felder. (+) Erhöhung, (-) Hemmung, (0) kein Effekt.

<i>Parameter</i>	<i>Frequenz &lt; 1 kHz</i>	<i>Frequenz &gt; 1 kHz</i>
<b>Kalzium</b>	(+), in S-Phase Peaks	während Feld (-), nach Feld (+)
<b>CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	(+)	während Feld (-), nach Feld (+)
<b>Nitrit</b>	(+)	(-)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	(+)	(-)
<b>cAMP</b>		0
<b>cGMP</b>		(+)
<b>PGE<sub>2</sub></b>		(+)/0
<b>MAPK</b>	(+), bei 16 Hz (-)	(+), bei Modulation mit 16 Hz (-)
<b>Proliferation</b>	(-)	(+)
<b>ALP-Aktivität</b>	(+)	(-)

Im unteren Frequenzbereich ist die Gesamtbewertung nicht so umfassend, da dort nicht alle Parameter bestimmt wurden. Generell sind die Ergebnisse der einzelnen Parameter qualitativ entgegengesetzt zu denen im oberen Frequenzbereich. Man beobachtet Hemmung des Wachstums bei gleichzeitiger Erhöhung der ALP-Aktivität und des oxidativen Stress. Die stärkste Wirkung wird durch die extrem niedrigen Frequenzen <2 Hz verursacht. Zudem ist der Effekt monopolarer Pulse größer als der symmetrischer Sinuswellen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Eigenschaften der Stimulationselektroden

Während kommerziell erhältliche Elektroden, die klinisch eingesetzt werden, gut standardisiert sind, gibt es relativ wenige Informationen über die Eigenschaften von Elektroden, die für Tierversuche oder *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden. Ohne dieses Wissen ist jedoch die Auswahl der für einen bestimmten Zweck geeigneten Elektrode schwierig. Dessen ungeachtet gibt es über die Eigenschaften spezieller Elektroden, insbesondere der Mikroelektroden kaum Publikationen. Die Modellierung von Elektrodenimpedanz und räumlicher Verteilung der Feldstärke erforderte jedoch die genaue Kenntnis bestimmter Parameter, die nur durch eigene Messungen zugänglich waren. Darum war das erste Ziel dieser Untersuchungen, Informationen über die Eigenschaften verschiedener zur Elektrostimulation eingesetzter Elektroden in echten physiologischen Lösungen zu gewinnen. Verschiedene Elektrodengeometrien und -materialien wurden verglichen und hinsichtlich ihrer Eignung für die elektrische Stimulation bewertet.

Die Fourieranalyse der verwendeten Signale ergab, dass man zur Beschreibung eines rechteckigen Elektrodensignals das Impedanzverhalten in einem umso größeren Frequenzbereich berücksichtigen muss, je kleiner das verwendete Tastverhältnis ist. Daher wurde die Charakterisierung der Elektroden in der Frequenzdomäne vorgenommen, wobei elektrochemische Methoden zum Einsatz kamen, die sehr gut geeignet sind, sowohl die Eigenschaften als auch die Änderungen der Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche zu untersuchen.

Der Vergleich der Elektroden für die Stimulation von Zellkulturen und der Mikroelektroden für die tiefe Hirnstimulation zeigte, dass erstere hinsichtlich ihrer elektrischen, elektrochemischen und mechanischen Eigenschaften deutlich besser abschneiden. Jedoch ist ihr Einsatz aufgrund ihrer Größe bei kleinen Gewebestrukturen nicht möglich. Die elektrischen Eigenschaften der Mikroelektroden erfahren eine zusätzliche Einschränkung durch die Anforderung der gleichzeitigen Ableitung und Stimulation, die während der Implantation der Elektroden notwendig ist. Da die Größe des stimulierten Gewebebereichs bei Mikroelektroden extrem stark von der Elektrodengeometrie abhängt, muss die Auswahl der geeigneten Geometrie nach der Größe des zu stimulierenden Areals getroffen werden. Wenn verschiedene Möglichkeiten in Betracht kommen, sollte immer die Elektrode mit der größten Oberfläche gewählt werden.

#### 6.1.1 Die Strom-Spannungs-Kennlinie ist nicht-linear

Alle untersuchten Elektroden besitzen eine nicht-lineare Strom-Spannungskennlinie, deren Anstieg frequenzabhängig ist. Die Ursache dafür liegt in der Frequenzabhängigkeit der Konzentrationspolarisation. Das Elektrodenmaterial spielt für den Verlauf dieser Kurve eine entscheidende Rolle, was einen weiteren Hinweis darauf gibt, dass elektrochemische Reaktionen beteiligt sind. Die Strom-Spannungskennlinie wird außer durch das Material auch durch die Oberflächenbeschaffenheit und den Abstand der Elektroden sowie die Zusammensetzung des Elektrolyts bestimmt [153]. Dieses nichtlineare Verhalten verursacht außerdem im unteren Frequenzbereich eine Verzerrung des Eingangssignals, wenn Spannungen oberhalb einer bestimmten Schwelle angelegt werden. Deswegen wurden in den durchgeführten Versuchen zur elektrischen Stimulation von Zellkulturen nur Spannungen unterhalb dieses Schwellenpotentials verwendet. Lokale pH-Veränderungen waren bei dieser Spannung nicht nachweisbar.

Die Frequenzabhängigkeit der Strom-Spannungskennlinie war bei Mikroelektroden (DBS) stärker ausgebildet als bei platinisierten Platinelektroden. Letztere zeigten bei der DBS-Stimulationsfrequenz von 130 Hz bereits lineares Verhalten während die Mikroelektroden noch deutlich nicht-linear waren. Grund dafür ist vermutlich die vergleichsweise geringe Stromdichte, die durch die fraktale Oberflächenbeschichtung der Platinelektroden erzielt wurde. Demzufolge sind platinisierte Platinelektroden in einem größeren Frequenzbereich einsetzbar und daher besonders für die Anwendung im niederfrequenten Bereich geeignet. Mikroelektroden sollten entweder nur für die

Stimulation mit Frequenzen oberhalb 1 kHz eingesetzt werden oder nur im linearen Strom-Spannungs-Bereich, d.h. mit kleinen Signalamplituden angesteuert werden.

Da innerer und äußerer Pol der Mikroelektroden aus unterschiedlichem Material gefertigt sind und verschieden große Oberflächen haben, war die Elektrodenkennlinie zudem asymmetrisch, d.h. es spielte eine Rolle, welcher Pol als Anode und welcher als Kathode geschaltet wurde. Diffusionsbegrenzte Prozesse und Adsorption könnten diese Differenz zwischen beiden Modi verursachen. Damit wird für den zeitlichen Verlauf des Feldes im Medium die Vorgeschichte der Elektrode bedeutsam.

Unter der Annahme der Linearität des Systems kann mit Hilfe der inversen Fouriertransformation aus dem Verhalten im Frequenzbereich auf dasjenige im Zeitbereich geschlossen werden. Diese Übertragung des Verhaltens zwischen Zeit- und Frequenzdomäne war jedoch problematisch und lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da das elektrochemische System über einen großen Bereich von Überspannungswerten nicht linear ist. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass Strom und Spannung der Butler-Volmer-Gleichung folgen, welche zwei exponentielle Terme enthält [187].

### 6.1.2 Das Verhalten der Elektroden in der Frequenzdomäne

Die Impedanzspektroskopie liefert wichtige Informationen über das Verhalten der Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche im Frequenzbereich. Dazu gehören u.a. die Doppelschichtkapazität (Adsorption, Filmbildung, Rauheit) und der Polarisationswiderstand (Ladungstransfer, Diffusion, metallische Auflösung). Vergleicht man die Impedanzspektren verschiedener Elektrodentypen und Elektrolyte zeigte sich, dass diese unterschiedlich stark von Grenzflächenprozessen dominiert werden. Mikroelektroden zeigten in allen Elektrolyten einen starken Einfluss von diffusionsabhängigen Prozessen, der bis zu einer Frequenz von 100 kHz überwog. Das weist darauf hin, dass im gesamten, für die Neurostimulation relevanten Frequenzbereich eine maximale Stromdichte existiert, die die Gesamtmenge, der ins Gewebe übertragbaren Ladung begrenzt.

Im Gegensatz dazu war der Kurvenverlauf von Pt/schwarz- bzw. besputterten Elektroden von der Leitfähigkeit und der Zusammensetzung der Lösung abhängig. Die günstigsten Eigenschaften besitzen Pt/schwarz-Elektroden, die aufgrund ihrer großen Oberfläche geringere Stromdichten erzeugen und elektrochemische Reaktionen somit länger im reversiblen Bereich ablaufen. Der lineare Abschnitt im unteren Frequenzbereich des Spektrums bildet sich zudem erst bei zunehmender Leitfähigkeit heraus. In Lösungen physiologischer Leitfähigkeit ist er jedoch vorhanden und spielt bis etwa 40 kHz eine Rolle. Bei kleineren Leitfähigkeiten befindet sich dieser Spektrumsanteil vermutlich unterhalb des gemessenen Frequenzbereichs. Besputterte Elektroden sind in ihrem Verhalten sehr uneinheitlich. Teilweise veränderten sich die Spektren innerhalb mehrerer Messwiederholungen, was auf eine zunehmende Adsorption von Reaktionsprodukten und/oder organischen Makromolekülen hindeutet. D.h., dass besputterte Elektroden weniger gute Eigenschaften für die Übertragung der Signal in Medium oder Gewebe besitzen, da Adsorption immer mit einer Verstärkung des kapazitiven Verhaltens verbunden ist. Letzteres bewirkt jedoch die Deformation von Spannungspulsen. Da es aber keine Alternative gab, durch die mit geringer Elektrodenspannung hohe Feldstärken im Medium erzeugt werden konnten, wurden diese Elektroden trotzdem für einige Versuche verwendet.

Die Elektrodenimpedanz ist ferner von der Stromdichte abhängig. Mit zunehmender Stromdichte nahmen sowohl Betrag als auch Phasenwinkel der Impedanz ab. Das bedeutet, dass der Ladungstransfer durch die Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt effektiver verläuft. Die untersuchten Pt/schwarz-Elektroden können dann im Frequenzbereich bis zu 100 kHz als ohmscher Widerstand betrachtet werden, was Fragen der Feldapplikation und Kontrolle erheblich erleichtert. So wird z.B. das durch die Eingangsspannung im Gewebe erzeugte Feld nicht frequenzabhängig verändert, wie es durch Kapazitäten der Fall wäre. Insbesondere beim Einsatz verschiedener Pulsformen oder Pulslängen ist diese Eigenschaft von Vorteil. Das Verhalten der Mikroelektroden lässt sich jedoch nicht auf diese Weise vereinfachen und man muss davon ausgehen, dass die ins Gewebe übertragene Wellenform vom Eingangssignal abweicht.

Dass die Impedanz von der Stromdichte abhängt, bedeutet auch, dass die Wellenform, die ins Gewebe übertragen wird, mit der Signalamplitude variiert. Das zieht eine ungleichmäßige Stimulation der Zellen in unmittelbarer Nähe der Elektrode nach sich.



Mikroskopische Ansichten der Elektrodenoberfläche zeigten, dass diese nicht glatt und gleichmäßig ist, sondern Fehler wie Risse und Kanten enthält. Diese können zu lokalen Inhomogenitäten der Ladungsdichte führen bzw. die Adsorption fremder Moleküle beeinflussen [165]. Um diese nicht-idealen Eigenschaften des Systems in einem Äquivalentschaltkreis korrekt wiederzugeben, ist daher die Einführung nicht-linearer Elemente notwendig. Im Fall der untersuchten Elektroden wurde ein modifiziertes CPE verwendet, das die nicht-linearen Eigenschaften sowohl der kapazitiven als auch der ohmschen Grenzflächenelemente berücksichtigt. Beide Anteile werden als kontinuierlich verteilt und frequenzabhängig vorausgesetzt. Die physikalische Bedeutung des CPE wurde in der Literatur vielfach diskutiert [188; 189]. Der verwendete Äquivalentschaltkreis entspricht einem modifizierten Schaltkreises nach Randles, dem Standardmodell elektrochemischer Systeme, und liefert sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, was die Verwendung dieses Modells zur Beschreibung des Systems Elektrode-Elektrolyt rechtfertigt. Modelle für Elektroden bzw. einen Vergleich der Elektrodenimpedanzen finden sich auch bei Hitz und Lasia [190], Bott [157] und Gielen und Bergveld [191]. Die Parameter der dort verwendeten Äquivalentschaltkreise konnten jedoch nicht zufriedenstellend an unsere experimentellen Daten angepasst werden. Daher wurde abweichend von diesen Modellen der Grenzflächenwiderstand frequenzabhängig betrachtet. Das ermöglichte, den in irreversible elektrochemische Reaktionen und Wärme umgesetzten Anteil der Eingangsspannung in das Systemverhalten einzubeziehen.

Der fraktale Exponent des CPE der untersuchten Elektroden hängt in erster Linie von der Geometrie und der Oberflächenbeschaffenheit ab. Dadurch besteht die Möglichkeit, Veränderungen der Elektrodenoberfläche über den Wert des fraktalen Exponenten zu verfolgen. Dieses Erkenntnis konnte bereits in der Untersuchung der Elektrodenalterung ausgenutzt werden (Kap. 6.1.4). Ausschließlich im Fall der Mikroelektroden ist der fraktale Exponent außerdem deutlich von der Leitfähigkeit des Elektrolyten abhängig. Diese Tatsache bestätigt ebenfalls den starken Einfluss der Konzentrationspolarisation auf das Verhalten der Mikroelektroden. Vergleiche von Leitfähigkeit und Kapazität des CPE, die den Eigenschaften der Grenzfläche entsprechen, zeigten ferner, dass der Ladungstransfer bei platinisierten Platinelektroden deutlich effektiver ablaufen kann, was sie für die Anwendung in der elektrischen Stimulation prädestiniert.

### 6.1.3 Räumliche Verteilung des Feldes

Mit Hilfe finiter Integrationstechnik wurden dreidimensionale Modelle verschiedener Elektroden in wässrigem Medium berechnet. Die Anwendung numerischer Simulationsmethoden birgt jedoch einige Einschränkungen. Als erstes wurde eine lineare Strom-Spannungscharakteristik vorausgesetzt, d.h. während der Stimulation soll an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt keine Polarisation auftreten. Eine weitere Einschränkung des Modells ergibt sich aus der Annahme, dass die Oberfläche der Elektrode perfekt glatt ist. Damit konnte wiederum vorausgesetzt werden, dass die elektrochemisch aktive Oberfläche der geometrischen Oberfläche entspricht. Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen zeigten jedoch, dass die Elektrodenoberfläche nicht absolut glatt, sondern, abhängig von Material und Verarbeitung mehr oder weniger rau ist. Die höhere effektive Oberfläche verursacht eine geringere Ladungsdichte auf der Elektrode. Diese ist aber nicht proportional zur absoluten Vergrößerung der Oberfläche, da innerhalb enger Poren die Diffusion begrenzend wirkt [192]. Überdies können Fehler in der Kalkulation dadurch verursacht werden, dass, um die Anzahl der Gitterpunkte zu begrenzen, mit einem ungleichmäßigen Gitter gearbeitet wurde.

Um verschiedene Applikationsanordnungen zu vergleichen, muss man die lokale und die mittlere Feldstärke im Medium und die Orientierung des Feldvektors heranziehen. Bei der von uns gewählten Anordnung für die Stimulation von Zellkulturen ist der Feldvektor parallel zum Boden der Messkammer orientiert. Da die Zellkulturen adhärent und flach ausgebreitet sind, haben die Zellen in Feldrichtung den größten Radius, was einen maximalen Effekt auf das Transmembranpotential zur Folge hat. Die Elektrodenanordnung zur Stimulation und Beobachtung auf Einzelzellniveau erzeugt eine nahezu homogene Feldverteilung, so dass alle Zellen vergleichbaren elektrischen Feldstärken ausgesetzt waren. Das war für die Auswertung von Einzelereignissen und dem Vergleich verschiedener Feldstärken auch unerlässlich. Im Gegensatz dazu liefert die Elektrodenanordnung zur Befeldung von Multiwellplatten eine inhomogene Feldverteilung, deren Unterschied zwischen dem Mittelwert und

dem Maximalwert Faktor 6 beträgt. Da bei diesen Messungen jedoch grundsätzlich Populationsmittelwerte erfasst wurden, kann diese Feldverteilung als zufriedenstellend gelten. Feldstärkemaxima, die direkt an den Elektroden auftreten, können aber zur lokalen Anhäufung von Elektrolyseprodukten beitragen und unerwünschte methodische Nebeneffekte verstärken.

Zur *in vivo* oder *in vitro* Befeldung von neuronalen Geweben kommen in der Praxis koaxiale Mikroelektroden zum Einsatz. Die Berechnungen zeigten aber, dass durch die koaxiale Geometrie die räumliche Verteilung der Feldstärke immer inhomogen ist. Der Grad dieser Inhomogenität ist jedoch u.a. abhängig von der Geometrie der Elektroden spitze und der Entfernung zwischen beiden Polen. Lokale Maxima traten an der Elektroden spitze und an der Grenzfläche Elektrode-Isolation auf. Mit zunehmender Entfernung von der differentiellen Elektrode nahm die Feldstärke ab, so dass je nach Geometrie und appliziertem Potential eine maximale Reichweite für die Stimulation vorgegeben ist. Diese wird natürlich auch von der Erregungsschwelle des spezifischen Zelltyps bestimmt [193].

Da die Feldverteilung in der Umgebung von Mikroelektroden durch unterschiedliche Geometrieparameter beeinflusst wird, wurde versucht, diese Faktoren in einem einheitlichen und vergleichbaren Geometriefaktor  $\gamma$  zusammenzufassen. Dieser verbindet die Stromstärke im Gewebe unabhängig von der Elektrolytleitfähigkeit mit der Elektroden spannung und kann als Auswahlkriterium verwendet werden. Abhängig von der Form der Elektroden spitze fanden wir einen sehr starken Einfluss auf die Reichweite, Stärke und Gradienten des elektrischen Felds. Gleiche Stimulationsparameter (Stromstärke bei „Constant Current“-Stimulation) erzeugen im Gewebe stark verschiedene elektrische Feldstärken. Die Elektroden geometrie spielt auch bei der Spannungsversorgung eine große Rolle. Um einheitliche Stromstärken im Gewebe zu erzeugen, muss für die berechneten Elektroden geometrien die applizierte Spannung bis zu Faktor 15 variiert werden. Das impliziert, dass der Anteil irreversibler Redoxreaktionen und die Korrosionsgeschwindigkeit ebenfalls deutlich verschieden sind. Daher können elektrochemisch bedingte Nebeneffekte der Stimulation und die Veränderung der Elektroden eigenschaften während der Alterung für verschiedene Geometrien nicht einheitlich beschrieben werden.

Besondere Bedeutung kommt der Größe der Elektroden oberfläche zu, da durch deren Vergrößerung eine homogenere Feldverteilung erreicht werden kann. Die maximale Größe der Elektrode ist allerdings von vornherein durch die Größe des zu stimulierenden Gewebebereichs begrenzt. Durch kleine Entfernungen zwischen den beiden Polen der Elektrode lässt sich der stimulierte Gewebebereich außerdem gut eingrenzen. Daraus lässt sich zusammenfassend schließen, dass es für die Stimulation von Gewebe keine ideale Elektrodenform gibt, die für alle Anwendungszwecke geeignet ist. Der Experimentator muss vielmehr die Elektrode entsprechend der Größe des zu stimulierenden Gewebebereichs auswählen.

Da die Stromdichte die Raten der in der Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche ablaufenden elektrochemischen Reaktionen widerspiegelt ( $H_2$ -Entwicklung,  $O_2$ -Entwicklung und Auflösung des Metalls), ist sie direkt mit der Korrosionskinetik verbunden. Daher kommt nicht nur der lokalen Feldverteilung in der Umgebung der Elektrode, sondern auch direkt auf ihrer Oberfläche eine besondere Bedeutung zu. Dabei zeigte sich, dass Elektrodenanordnungen zur Befeldung von Zellkulturen, die symmetrisch und mit relativ großem Elektrodenabstand aufgebaut sind, die Verteilung der Stromdichte auf der Elektroden oberfläche gleichmäßig ist. Daher laufen elektrochemische Effekte und Korrosion räumlich gesehen ebenfalls gleichmäßig ab. Trotz intensiver Nutzung war optisch keinerlei Verschleiß, der auf eine ungleichmäßige Abtragung des Elektrodenmetalls schließen lässt, festzustellen. Im Gegensatz dazu war die räumliche Verteilung der Stromdichte bei allen Mikroelektroden stark inhomogen. Das äußert sich in der ungleichmäßigen Verteilung der Stromdichte im umgebenden Gewebe, aber auch direkt auf der Oberfläche des inneren Pols der Elektrode. Es konnte gezeigt werden, dass die Orte erhöhter Stromdichte auch Orte verstärkter Korrosion sind. Da der Spannungsabfall in der Grenzfläche von der lokalen Stromdichte abhängt, ist die Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche somit keine Äquipotentialoberfläche. Das wird hinsichtlich der Effektivität der Stimulation zu verschiedenen starken Erregungszuständen in der behandelten Gehirnregion führen.

Da die Impedanz von der Stromdichte abhängig ist, wird das nach inverser Fouriertransformation resultierende Signal durch die ungleichmäßige Zusammensetzung der harmonischen Frequenzen verformt werden. Das bedeutet, dass die im Gewebe induzierte Wellenform von dem rechteckförmigen

Eingangssignal abweicht. Das impliziert außerdem, dass Orte unterschiedlicher Stromdichte auch durch unterschiedliche Signalformen und -amplituden stimuliert werden.

#### 6.1.4 Der Einfluss von Alterung und Korrosion auf das Elektrodenverhalten

Korrosion tritt auf, wenn mindestens eine anodische und kathodische Reaktion gemeinsam stattfinden. Da diese Reaktion mit dem Transfer von Ladungen verbunden ist, sind Korrosionsphänomene elektrochemischer Natur und werden daher Metallelektroden während der Elektrostimulation immer betreffen. Das kann zur Ablagerung von Elektrodenmaterialien im Gewebe sowie zur Auflösung des Elektrodenmaterials und dem Verlust der mechanischen Stabilität führen. Schlussendlich kann das zum Verlust des elektrischen Kontakts und damit zum Versagen des Stimulationssystems führen. Die Freisetzung von Metall ist außerdem eine potentielle Quelle für Proteindenaturierung und Apoptose [162].

Aus diesem Grund wird es als sicher angesehen, dass die Löslichkeit von Korrosionsprodukten und die Korrosionsresistenz von Metallelektroden sehr große Bedeutung für die Biokompatibilität und die Langzeitstabilität haben und Elektrodenmaterialien daher sorgfältig ausgewählt werden sollten [194]. Pt und Pt/Ir-Legierungen gehören daher zu den am weitesten verbreiteten Elektrodenmaterialien, da sie biokompatibel sind und gute elektrische, mechanische und chemische Eigenschaften besitzen. Ein weniger edles Metall ist normalerweise nicht so korrosionsbeständig. Dementsprechend fanden wir die stärksten Korrosionseffekte bei Edelstahlelektroden. Sowohl das Elektrodenmetall als auch die Epoxyisolation waren teilweise aufgelöst und die Oberfläche durch die Bildung kleiner Vertiefungen aufgeraut worden. Daher sollten an Stelle der Edelstahlelektroden auf jeden Fall Elektroden aus einem reinen Edelmetall oder einer Edelmetalllegierung eingesetzt werden. Als Folge solcher Korrosionsvorgänge sollten z.B. Dünnschicht-Elektroden nur kurze Lebensdauern haben und daher für Implantationszwecke ungeeignet sein. Nach McCreery empfiehlt sich für die Langzeitstimulation eher die Verwendung von Metalloxid-Elektroden, die die Korrosion einschränken, oder dickerer Platinelektroden [162]. Außerdem sollte regelmäßig überprüft werden, ob der elektrische Kontakt der Elektroden in Ordnung ist, da durch Veränderungen der Oberfläche, z.B. durch Bildung einer Oxidschicht, und Materialbrüche die Elektrodenmaterialien beeinträchtigt werden können.

Die Verwendung des anorganischen Elektrolyten (ACSF) im Vergleich zu komplettem Zellkulturmedium erlaubte es, den Einfluss (geladener) organischer Moleküle auf das elektrochemische Verhalten der Elektrode einzuschätzen. Die meisten Arbeiten, die bisher über das elektrochemische Verhalten von Elektroden veröffentlicht wurden, behandeln nur Messungen in anorganischen Lösungen oder repräsentativen physiologischen Puffern wie PBS. Es gibt aber nahezu keine Daten, die in echten physiologischen Medien, die verschiedene und z.T. komplexe organische Bestandteile enthalten, aufgenommen wurden.

Polarisierbare Makromoleküle im Elektrolyten senkten den Einfluss der Konzentrationspolarisation und es wurde bereits bei niedrigeren Frequenzen ein lineares Strom-Spannungs-Verhalten beobachtet. Eine denkbare Erklärung ist die Bildung eines Proteinfilms auf der Elektrodenoberfläche, die den Aufbau oder Abbau einer Oxidschicht und damit das Entstehen einer entsprechenden Reaktionsüberspannung behindert [194].

Beim Eintauchen der Elektroden in Zellkulturmedium, veränderte sich die Metall-Elektrolyt Grenzfläche, da organische Moleküle an der Elektrodenoberfläche adsorbiert wurden. Messungen des Phasenwinkels wiesen ebenfalls auf eine zusätzliche Kapazität im System hin. Die Anpassung der Daten an den Äquivalentschaltkreis erforderte dementsprechend die Einführung einer weiteren Kapazität, um die Bedeckung der Oberfläche zu berücksichtigen [194]. Nach längerer Inkubation in Elektrolyt hatten die Parameter des Äquivalentschaltkreises ein Plateau erreicht. Das deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Oberfläche der Elektrode vollständig von Oxid oder Protein bedeckt war, was eine weitere Korrosion verhinderte [154]. Die beobachtete Alterung der Elektroden bietet eine mögliche Erklärung für die Notwendigkeit, die Stimulationsparameter während einer therapeutischen Langzeitstimulation nachzuregeln.

## **6.2 Der Einfluss elektrischer Stimulation auf das Signalsystem von Knochenzellen – Integration der Ergebnisse in ein Modell**

PEMF werden derzeit in der Behandlung von Pseudoarthrose [195], Frakturen [196] und Mineralisationsstörungen eingesetzt. Auf zellulärer Ebene können sie direkt Osteoklasten [197], Osteoblasten [107; 123; 198] und Osteocyten [151] beeinflussen.

Die vorliegenden Untersuchungen zur Beeinflussung von Knochenzellen durch elektrische Felder beinhalten nahezu alle Ebenen der zellulären Reaktionskette. Um den Wirkungsmechanismus zu verstehen, wurden alle Parameter an einem Zell- und Befeldungssystem gemessen. Dadurch können Setup, Zelllinie und Befeldungsprotokoll direkt verglichen und die Ergebnisse in einem Modell zusammengefasst werden können. In der Literatur gibt es bisher keine derartig umfassende Studie. Selten wurden mehr als 2-3 verschiedene Parameter erfasst. Außerdem wurde ein breiter Frequenzbereich mit z.T. verschiedenen Wellenformen gescannt, was in der Literatur ebenfalls noch nicht zu finden ist.

Vergleicht man die experimentellen Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen muss man feststellen, dass sich die Osteosarcomazellen (HOS TE85) in fast allen gemessenen Parametern stärker durch die Anwendung elektrischer Felder beeinflussen lassen als primäre Osteoblasten. Da es sich bei ersteren um humane, bei letzteren jedoch um Schweinezellen handelt, ist nicht auszuschließen, dass dieser Unterschied artbedingt ist. Außerdem scheint für Osteoblasten das Vorliegen von Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium notwendig zu sein, um eine feldvermittelte Proliferation zu induzieren [199]. Für die humanen Osteosarcomazellen MG-63 [111] und TE85 [112] wurde hingegen gefunden, dass sie auch unter serumfreien Bedingungen positiv stimuliert werden. Dieses scheinbar unterschiedliche Verhalten von normalen und transformierten Knochenzellen könnte mit der Fähigkeit transformierter Zellen zusammenhängen, unter Feldexposition verstärkt Wachstumsfaktoren freizusetzen. Dieser autokrine und/oder parakrine Mechanismus kann dann wiederum zur erhöhten Proliferation führen.

Für Kulturen von HOS TE 85 wurde gezeigt, dass sie in vitro differenzieren und mineralisieren und daher gut als Modell geeignet sind [200]. Vergleicht man HOS TE85 mit den Eigenschaften primärer Osteoblasten, zeigt sich jedoch, dass Effekte, die an Osteosarcomazellen gefunden wurden, nicht unbedingt auf primäre Osteoblasten übertragen werden können. Ursache dafür ist zum einen, dass die Osteosarcomazellen aufgrund ihrer malignen Transformation ein verändertes Wachstumsverhalten zeigen und sich andererseits Osteoblastenkulturen aus Zellen verschiedener Differenzierungsstadien zusammensetzen und daher sehr heterogen sein können [201]. Trotz dieser Einschränkungen können Osteosarcomazellen dazu beitragen, die Funktion und Regulation von Osteoblasten besser zu verstehen. Experimente, die für ausgewählte Parameter an der Fibroblastenlinie L929 durchgeführt wurden, zeigen außerdem, dass die beobachteten Effekte nicht spezifisch für Knochenzellen sind.

Über den Nachweis verschiedener „second messenger“, parakriner Faktoren, des Redoxstatus der Zelle, die Aktivierung des Zellkerns sowie Veränderungen in Wachstum und Differenzierung konnte gezeigt werden, dass elektrische Felder das Signalsystem und den Stoffwechsel von Knochenzellen beeinflussen können. Dabei konnten im gesamten untersuchten Frequenzbereich Feldeffekte gefunden werden, die Richtung des Nettoeffekts war jedoch im oberen und im unteren Frequenzbereich unterschiedlich. Unterschiede in der Wirkung gepulster und sinusförmiger Felder wurden ebenso wenig wie Frequenzfenster festgestellt. Ob die eingesetzte elektrische Stimulation die Fähigkeit besitzt, Matrixbildung und Mineralisation zu modifizieren, wurde jedoch nicht überprüft.

Bei Feldstärken unter 30 V/m traten kaum Feldeffekte auf, im mittleren Feldstärkebereich von 30 V/m, bis 300 V/m waren die beobachteten Effekte maximal. D.h., dass durch induktive und kapazitive Feldapplikationen die nötigen Feldstärken im Medium kaum erreicht werden können. Ausreichende Feldstärken können also nur mittels Elektroden erreicht werden.

Da alle Ergebnisse an einem einheitlichen System erhalten wurden, lassen sie sich in ein Schema zur Wirkungsweise elektrischer Felder integrieren (Abb. 6-1). Der einzige bereits existierende Vorschlag zum Mechanismus der zellulären Wirkung von kapazitiv und induktiv eingekoppelten Feldern stammt

aus der Gruppe von Brighton et al. [29; 137]. Dieses Modell sieht prinzipiell die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration vor, die im kapazitiven Fall über spannungsabhängige Kanäle und im induktiven Fall durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgen soll. Kalzium kann dann die Ausschüttung von  $\text{PGE}_2$  stimulieren und über Calmodulin die Proliferation beeinflussen. Das Modell könnte somit eine Analogie zwischen elektromagnetischer und mechanischer Stimulation herstellen, da alle Prozesse in der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration münden.

Unsere Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit dem von Brighton vorgeschlagenen Signalweg. Das Modell, das hier vorgestellt werden soll, geht jedoch noch etwas weiter, da es neben dem „second messenger“ Kalzium auch die Beteiligung anderer Signalwege aufzeigt.

Da die hohe Impedanz der Zellmembran und die hohe Leitfähigkeit im Zytoplasma verhindern, dass elektrische Felder mit Frequenzen unter 1 MHz in das Zellinnere eindringen können, müssen Prozesse an der Zellmembran für das Entstehen von Feldeffekten verantwortlich sein. Dazu gehören die Aktivierung von Membranrezeptoren sowie die Beteiligung von Ionenkanälen und Membranproteinen. Aufgrund der Ergebnisse der Kalziummessungen ist allerdings nicht anzunehmen, dass die Wirkung elektromagnetischer Felder durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird. Thermische Effekte werden ebenfalls ausgeschlossen, da der Effekt frequenzabhängig und die Temperaturänderung in der Messkammer vernachlässigbar ist.

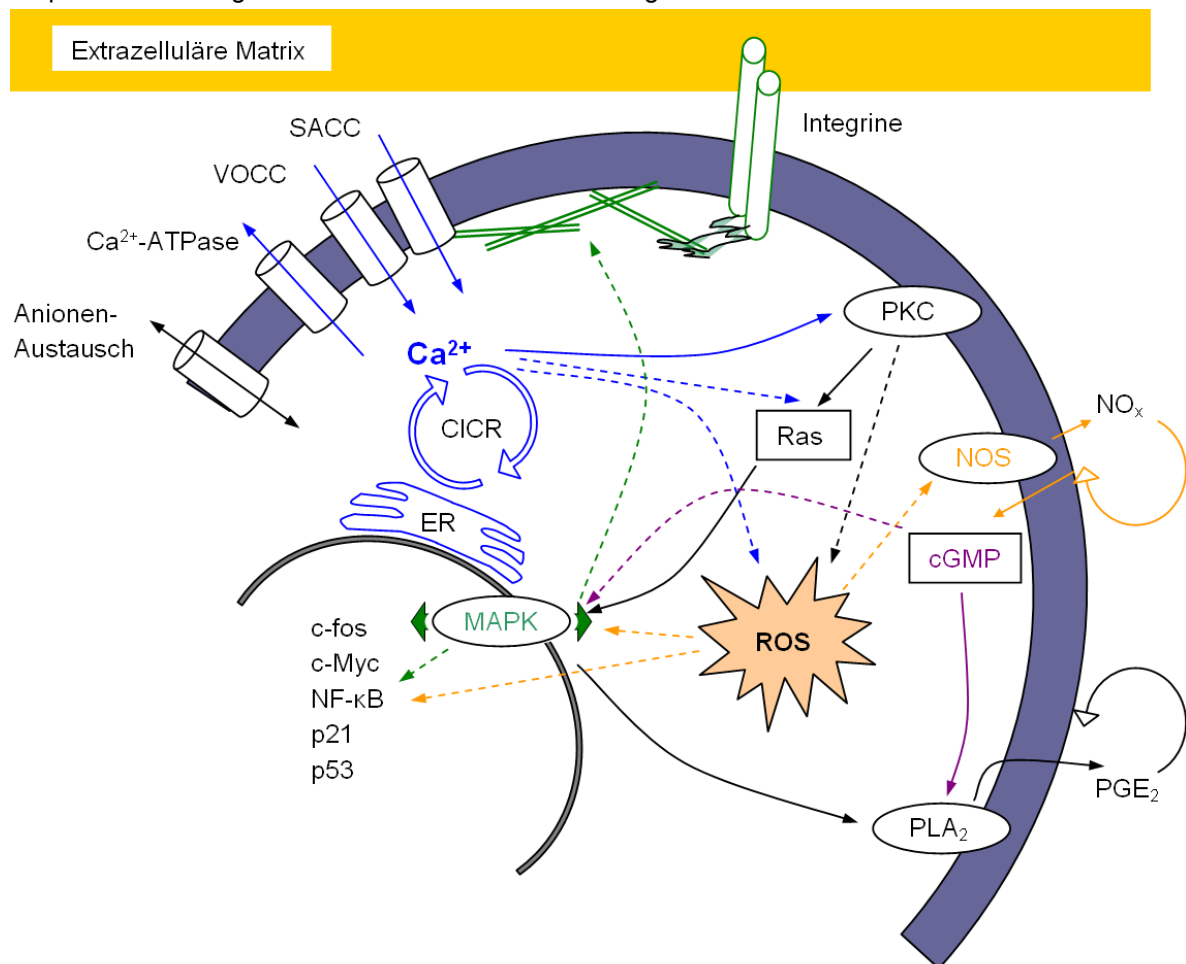


Abb. 6-1 Schema zur Signaltransduktion, die durch die Wirkung elektrischer Felder hervorgerufen wird. Der Kalziuminflux über spannungs- und dehnungsabhängige Kanäle und die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Außerdem sind cGMP,  $\text{PGE}_2$  und die MAPK an der Signaltransduktion beteiligt, die wiederum durch den Redoxzustand moduliert werden können. Durch die Translokation aktivierter MAPK können Informationen an den Zellkern weitergeleitet und in Signale umgewandelt werden, die Wachstum und Genexpression regulieren.

Wahrscheinlicher ist die Beeinflussung spannungs- und dehnungsabhängiger Ionenkanäle, da durch das elektrische Feld bzw. die damit verbundene elektroosmotische Strömung das Transmembranpotential der Zelle beeinflusst bzw. die Zellmembran mechanisch verformt wird. Die Aktivierung spannungs- und dehnungsabhängiger Kalziumkanäle führt nachfolgend zu einem verstärkten Influx extrazellulären Kalziums. Außerdem wird Kalzium aus intrazellulären Speichern

freigesetzt. Beide Prozesse führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Beeinflussung der Transportraten von ATP-abhängigen Ionenpumpen, wie sie durch höherfrequente Felder möglich ist, kann die intrazelluläre Ionenkonzentration zusätzlich modulieren.

Kalzium kann nachfolgend verschiedene Proteine wie PKC, NOS und MAPK aktivieren. Durch die Translokation aktivierter MAPK können Informationen an den Zellkern weitergeleitet und in Signale umgewandelt werden, die Wachstum und Genexpression regulieren. Außerdem sind auch cGMP und PGE<sub>2</sub> an der Signaltransduktion beteiligt. Letzteres kann über parakrine Mechanismen zur Stimulation weiterer Zellen führen und so die primäre Feldwirkung verstärken. Alle diese Prozesse können wiederum durch den Redoxzustand moduliert werden.

Die verschiedenen Elemente der Signalübertragung sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 6.2.1 Elektrisches Feld bewirkt Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Als Reaktion auf ein externes elektrisches Feld konnten wir verschiedenartige Veränderungen der internen Kalziumkonzentration beobachten. Dazu gehörten sowohl transiente als auch dauerhafte Veränderungen sowie Oszillationen. Damit unterschied sich die Kinetik der intrazellulären Kalziumkonzentration unter dem Einfluss der elektrischen Stimulation prinzipiell von anderen, rezeptorvermittelten Zellprozessen. In letzterem Fall wird durch die spezifische Bindung des Agonisten an den Rezeptor eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die einen eindeutigen und dosisabhängigen zellulären Effekt vermittelt. Als Bestandteil der Signalkaskade trägt Kalzium vorrangig durch schnelle, transiente Konzentrationsveränderungen zur Weiterleitung externer Stimuli bei. Die Reaktionen auf die Applikation elektrischer Felder waren jedoch sehr heterogen und ähneln darin den UVA-bedingten Zellreaktionen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass keiner der beiden Effekte durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird.

Da die Kalziumkonzentration der Kontrollen und der befeldeten Zellen mit der Zeit und der damit zunehmend akkumulierten Gesamtstrahlungsdosis ansteigt, andererseits durch vermutlich einsetzende Regulationsmechanismen der Zelle nach endlicher Zeit ein Konzentrationsplateau erreicht ist, ist es vorstellbar, dass Differenzen der Kalziummittelwerte nur temporär sind. Für ein derartiges Plateau der Kalziumkonzentration spricht auch, dass nur wenige Einzelwerte das Dreifache der Ausgangskonzentration übersteigen. Außerdem würde ein dramatischer Anstieg der Kalziumkonzentration zur Apoptose führen.

Die Applikation niederfrequent gepulster elektrischer Felder bewirkt allgemein einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser war jedoch zeitlich nicht auf die Dauer der Feldapplikation begrenzt. Die Verteilung der Intervallmedianwerte war in allen Versuchsgruppen linksschief. D.h. viele Zellen hatten einen überdurchschnittlich hohen Kalziumgehalt. Bei Feldexperimenten erhöhte sich außerdem die Spannweite der Verteilung und verschob sich zu höheren Konzentrationen. Veränderungen in der Verteilungsform waren jedoch nicht zwangsläufig mit einer Verschiebung des Medians verbunden. Teilweise war die Herauslösung einer Subpopulation mit erhöhter mittlerer Kalziumkonzentration zu beobachten. Das impliziert, dass ein Teil der Zellen sensibler für das elektrische Feld war und mit einem Kalziumsignal reagiert hat. Bezogen auf den Knochen heißt das auch, dass nicht alle Zellen durch das elektrische Feld stimuliert werden, sondern nur solche Zellen, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befinden.

Die stärksten Effekte traten im mittleren Feldstärkebereich von 30 V/m bis 300 V/m und in der Nachbeobachtungszeit auf. Daher sind überwiegend langsame, andauernde Anstiege der Kalziumkonzentration durch Kalziuminflux oder Peaks mit nachfolgend erhöhter Konzentration zu vermuten. Diese Schlussfolgerungen sind in guter Übereinstimmung mit in der Literatur dargestellten Wirkungen auf den Kalziuminflux [107; 202]. Letztendlich wird die zytosolische Kalziumkonzentration der Zellen durch die Feldwirkung längerfristig erhöht.

Unter zusätzlichem oxidativen Stress traten die beschriebenen Verteilungsunterschiede stärker hervor. Die Effekte waren dann in einem größeren Feldstärkebereich zu beobachten und manifestierten sich in einer echten Verschiebung des Medians. Das weist auf eine synergistische Wirkung niederfrequenter Felder und oxidativem Stress hin [203].

Wurden amplitudenmodulierte elektrische Wechselfelder eingesetzt, traten im Vergleich zu niederfrequenten Pulsen nur geringe Veränderungen der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration auf. Der Anstieg der Kalziumkonzentration setzte meist verzögert, d.h. nach der Feldapplikation ein. Auch hier war die Verteilung der Intervallmedianwerte linksschief. Unterschiede in der Verteilung zeigten sich vor allem in deren Breite und der Schiefe sowie dem Auftreten von lokalen Dichtemitteln in den befeldeten Gruppen. Letztere sind charakteristisch für Subpopulationen und traten bei Frequenzen größer als 1 kHz, jedoch nicht bei 3 kHz auf. Diese Subpopulationen enthielten Zellen mit erhöhter Kalziumkonzentration; die mittlere Konzentration der Hauptpopulation wurde dadurch kaum verändert. Die Ergebnisse sprechen ferner für eine geringfügig stärkere Wirkung der mit 16 Hz modulierten Felder. Verweise auf die besondere Wirksamkeit von 16 Hz bzw. eine Amplitudenmodulation mit dieser Frequenz finden sich in der Literatur seit langer Zeit [109; 115; 116; 186].

### 6.2.2 Feldeffekt beteiligt Influx extrazellulären Kalziums und Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern

Im Gegensatz zu unsynchronisierten Zellpopulationen waren bei synchronisierten Zellen in der S-Phase deutlichere Veränderungen der internen Kalziumkonzentration als Reaktion auf ein externes elektrisches Feld zu beobachten. Die Zellreaktionen waren nach wie vor heterogen, enthielten aber einen deutlich erhöhten Prozentsatz an Peaks. Diese waren verschieden lang und traten z.T. wiederholt und zu verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf die Feldapplikation auf. Daher scheint es keine einheitliche Latenzzeit bzw. Minstdauer für die Feldeinwirkung für HOS TE85 zu geben.

Wenn Kalziumpeaks beobachtet wurden, dann reagierten benachbarte Zellen oft gleichzeitig oder in kurzer Folge. Die Ausbreitung von Kalziumpeaks zwischen Osteoblasten mittels Kalziumabhängiger Kalzium-Freisetzung (CICR) wurde bereits früher beschrieben [204]. Da Gap Junctions in HOS-Kulturen von uns nachgewiesen wurden (Kap. 3.1.1.6), weist dieser Fakt auf eine mögliche Übertragung und Weiterleitung der Zellreaktion durch interzelluläre Kommunikation hin.

Der hohe Anteil an Kalziumpeaks bei synchronisierten Zellen legt außerdem den Schluss nahe, dass sich Zellen während der frühen S-Phase in jenem bevorzugten Zellzustand befinden, der sie für die elektrische Stimulation sensibilisiert.

Da hier relativ starke und eindeutige Reaktionen der Zellen auf das eingestrahlte Feld auftraten, sind diese Experimente geeignet, Hypothesen über den zugrundeliegenden Mechanismus und das zeitliche Verhalten aufzustellen. Es gibt prinzipiell zwei Signalwege, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen. Einerseits kann der Anstieg durch einen verstärkten Influx über die Zellmembran vermittelt werden oder andererseits durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Um die Beteiligung des Kalziuminflux zu überprüfen, wurde der Einfluss des elektrischen Feldes in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium durchgeführt.

Die Anwesenheit des Kalziumchelators EDTA in der Außenlösung verringerte v.a. die Intensität der beobachteten Reaktionen. D.h., dass für die beobachteten Effekte zumindest teilweise extrazelluläres Kalzium verantwortlich ist. Jedoch konnten auch in EDTA-haltigem Puffer immer noch intrazelluläre Kalziumpeaks ausgelöst werden. Auch langsamere Veränderungen, die sowohl zur Erhöhung der Konzentration als auch zu deren Erniedrigung führen können, traten auf. Lediglich sehr schnelle, sprungartige Erhöhungen der internen Kalziumkonzentration konnten bei Anwesenheit von EDTA nicht beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass diese langfristigen und auch sehr starken Effekte durch verstärkten Influx extrazellulären Kalziums hervorgerufen werden.

Insbesondere bei niedrigen Frequenzen wird durch das externe elektrische Feld das Membranpotential der Zelle verändert. Z.B. beträgt das induzierte Membranpotential 3 mV bei einer mittleren Feldstärke von 200 V/m und einem Zellradius von 10  $\mu\text{m}$  (Gleichung 2). Die minimal bzw. maximal in den Versuchen eingesetzte Feldstärke von 10 V/m bzw. 3 kV/m würde das Membranpotential um 0.1 mV bzw. 45 mV verändern. Im Vergleich dazu beträgt die Rauschspannung der Membran ca. 25  $\mu\text{V}$ . Das zeigt, dass mittlere und hohe Feldstärken in der Lage sind, das Membranpotential von Einzelzellen signifikant zu verändern, so dass spannungsabhängige Ionenkanäle beeinflusst werden können. Da die untersuchten Zellen durch Gap Junctions chemisch und elektrisch verbunden sind, erhöht sich der effektive Radius für die Berechnung des induzierten

Membranpotentials. D.h., dass das Membranpotential von Zellverbänden, wie sie in unseren Versuchen verwendet wurden, durch das elektrische Feld stärker beeinflusst wird und die Zellen daher in der Lage sein sollten, auch Felder geringer Stärke wahrzunehmen kann [147].

Daher könnte der beschriebene Influx durch spannungsabhängige Kalziumkanäle vermittelt werden, deren Existenz an Osteoblasten und Osteosarcomazellen nachgewiesen ist [205-208]. Übereinstimmend damit finden sich in der Literatur weitere Arbeiten, die als Reaktion auf eine niederfrequente Befeldung einen erhöhten Kalziuminflux über spannungsabhängige Kanäle beschreiben [105; 107; 117; 202; 209]. Außerdem fanden Meszaros et al. [206], dass der spannungsabhängige Kalziumkanal von HOS TE85 vom L-Typ ist, d.h. er bewirkt langsame Veränderungen der Konzentration und könnte daher für die beobachteten Kalziumeffekte mitverantwortlich sein.

Andererseits wäre auch die Beteiligung dehnungsabhängiger Kalziumkanäle vorstellbar [202], da ein elektrisches Feld entlang einer geladenen Oberfläche, wie sie das Substrat oder der Zellrasen darstellt, eine elektroosmotische Strömung hervorruft, die eine Scherkraft auf die Zelle ausüben kann. Dieser Mechanismus wäre jedoch durch die Viskosität des Mediums, die eine Zeitkonstante im Bereich von Millisekunden für das Einsetzen einer Strömung mit sich bringt, auf den niederfrequenten Bereich beschränkt. Außerdem ist nicht klar, wie sich eine solche Strömung in der Messkammer ausbildet. In einem geschlossenen System, wie es im Knochen vorliegt, ist die Beteiligung mechanosensitiver Elemente jedoch wahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu bewirkte das Fehlen extrazellulären Kalziums in unseren Experimenten jedoch nicht, dass der interne Kalziumanstieg komplett verschwand. In geringerem Ausmaß traten immer noch Veränderungen der intrazellulären Konzentration auf. Das weist darauf hin, dass auch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern eine Rolle bei der Vermittlung des Feldeffekts spielt. Dies gilt insbesondere für das Entstehen von Peaks bzw. Oszillationen. Die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern könnte durch den Influx von extrazellulärem Kalzium getriggert sein und der Influx damit einen zellulären Verstärkungsmechanismus darstellen [121].

Da besonders unter dem Einfluss höherfrequenter Felder sowohl Anstiege als auch Verminderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration auftraten, ist anzunehmen, dass durch die Feldwirkung v.a. die Transportrate für Kalzium verändert wird. Solche Effekte wurden in Zusammenhang mit der Theorie des „Electroconformational Coupling“ beschrieben [210; 211]. Das kann zum einen durch Aktivierung/Inaktivierung von bestimmten Ionenkanälen und zum anderen durch Veränderung der Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen erfolgen. Das würde in Abhängigkeit vom Verhältnis intrazellulärer zu extrazellulärer Kalziumkonzentration bereits zu zwei verschiedenen Effekten führen. Bei hohem bzw. normalem extrazellulärem Kalziumspiegel würde Kalzium über geöffnete Kanäle verstärkt in die Zelle einströmen. Wenn extrazelluläres Kalzium fehlt, würde aus intrazellulären Reservoirs Kalzium in das Zytosol freigesetzt werden bzw. aus der Zelle ausströmen.

Wenn die beobachteten Kalziumsignale zu den primären Ereignissen als Antwort auf ein externes elektrisches Feld gehören, dann müsste das intrazelluläre Kalzium nachfolgende Prozesse aktivieren, die zur Beeinflussung der Genexpression und zur Aktivierung benachbarter Zellen führen. Das könnte z.B. über Calmodulin, cAMP, NO oder  $\text{PGE}_2$  erfolgen. Zusammenhänge zwischen den genannten Komponenten wurden in der Literatur beschrieben.

### 6.2.3 Durch die Fluoreszenzanregung von Fura-2 werden die beladenen Zellen einer relevanten UVA-Strahlungsdosis ausgesetzt

Unsere Ergebnisse zeigen, dass zumindest bei Verwendung des Attofluor-Messplatzes und des Farbstoffs Fura-2 die beladenen Zellen einer nicht zu unterschätzenden UVA-Strahlungsdosis ausgesetzt sind. Die Strahlungsdosis und die Dosisleistung konnten mit Hilfe einer kalibrierten Photozelle für jeden Versuch individuell bestimmt werden. Durch Variation des Messtaktes konnten verschiedene Strahlungsdosen eingestellt werden. Durch dieses Vorgehen lies sich jedoch nur die Dosis, nicht die Dosisleistung verändern.

Als Reaktion auf die applizierte UVA-Dosis beobachteten wir ein sehr heterogenes Verhalten der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das beinhaltete sowohl transiente Veränderungen als auch andauernde Konzentrationsanstiege. Der prozentuale Anteil erhöhter Kalziumkonzentration korreliert



vor allem mit der Strahlungsdosis, weniger mit der Strahlungsdosisleistung. Da aber beide Parameter mit zunehmendem Lampenalter abnehmen, konnten sie nicht unabhängig voneinander verändert werden. Es ist daher unmöglich zu entscheiden, ob der beobachtete Effekt primär von der Dosis oder der Dosisleistung oder von beiden Parametern abhängt. Dieses Verhalten wurde sowohl für Osteosarcomazellen als auch für primäre Osteoblasten festgestellt. Letztere verfügen jedoch über eine weitaus höhere Empfindlichkeit gegenüber UVA-Strahlung (Faktor 2-3).

In Versuchen, die in Anwesenheit von EDTA in der Außenlösung durchgeführt wurden, nimmt der Anteil des UV-bedingten Konzentrationsanstiegs stark ab. Das lässt darauf schließen, dass dieser Prozess vor allem durch den Influx extrazellulären Kalziums getragen wird. Nachfolgende kalziuminduzierte intrazelluläre Kalziumausschüttungen, die als Verstärkungsmechanismus dienen könnten, sind jedoch nicht auszuschließen. Entsprechende Ergebnisse fanden auch Goren et al. [212], Sakai et al. [213] und Kikuyama et al. [214]. Hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, aber auch die entstehenden Radikale können zytotoxisch wirken, was in den Versuchen z.T. auch morphologisch erkennbar war.

Der UV-Effekt trat bei sehr geringen Dosen nicht auf, bei hohen Dosen reagierten jedoch alle Zellen. Das deutet darauf hin, dass es keinen Zellzustand gibt, der vollständig resistent gegen UV-Strahlung ist. Es ist eher von zellzyklusabhängigen Halbwertsdosen auszugehen. Diese Vermutung konnte durch die gefundene Abhängigkeit der UV-Empfindlichkeit vom Zellstadium experimentell bestätigt werden. Besonders sensibel zeigten sich die  $G_2$ -Phase und der  $G_1/S$ -Übergang. Das lässt sich durch die Zellzyklus-Kontrollpunkte in diesen Phasen erklären, die absichern müssen, dass die äußeren und inneren Bedingungen der Zelle für die Replikation der DNA und die Mitose geeignet sind. Insbesondere der  $G_2$ -Kontrollpunkt wird als UV-Kontrollpunkt angesehen [215]. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Zellzyklus und UV-Sensibilität wurden bereits von Cooke et al. [216], Orren et al. [217], De Laat et al. [218], Yamamoto et al. [219], Petersen et al. [220] berichtet. Außerdem fanden Naderi et al. [221], dass Zellen im Ruhezustand ( $G_0$ ) resistent gegen oxidativen Stress (durch  $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) sind. Diese Wirkung ist zumindest partiell auf einen erhöhten Glutathion-Spiegel zurückzuführen.

Die experimentellen Bedingungen wie Serumgehalt der Lösung und Begasung mit  $\text{CO}_2$  können den oxidativen Stress auf die Zellen zusätzlich erhöhen und diese so für weitere physikalische oder chemische Reize sensibilisieren. Im Gegenzug kann die Anwesenheit von Serum bzw. verschiedenen Radikalfängern im Medium UV-bedingte Effekte reduzieren [119; 222; 223].

Da der UV-Effekt methodisch bedingt ist, war es notwendig bei Messungen mit dem Farbstoff Fura-2 die Strahlungsdosis zu berücksichtigen. Insbesondere für längere Messungen zur Erfassung der Kalziumkinetik können die UV-bedingten Effekte nicht vernachlässigt werden. Die Tatsache, dass die Beleuchtungsstärke innerhalb des Gesichtsfeldes nicht homogen ist, kann ebenfalls zu heterogenen Ergebnissen beitragen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden daher innerhalb einer Versuchsreihe identische Belichtungsprotokolle mit gleichbleibendem Messintervall verwendet.

Unterschiedliche Belichtungsverhältnisse könnten heterogene Ergebnisse innerhalb des Gesichtsfeldes aber auch zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen erklären. Es gibt nicht wenige Arbeitsgruppen, die die Fura-2-Methode für Kalziummessungen nutzen [224-226] und daher von ähnlichen Artefakten betroffen sein müssten. Publikationen finden sich zu diesem Thema jedoch nicht. Allerdings findet man in der Literatur eine Vielzahl von Arbeiten, die die Wirkung von UVA-Strahlung auf einzelne Zellen und Zellpopulationen untersuchen. Für verschiedene Zelltypen wurden im selben Dosisbereich wie bei unseren Messungen Wirkungen beschrieben. Diese beinhalten die Aktivierung der Proteinsynthese [23; 227; 228], Veränderung der Proteinkinaseaktivität [229], Veränderung der Membraneigenschaften [230-232] und des Zytoskeletts [233] sowie die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollgenen [218; 234; 235] und die Stimulation der Proliferation [212; 236].

Prinzipiell muss man davon ausgehen, dass die Möglichkeit von Artefakten in allen Fluoreszenzmethoden besteht, insbesondere bei ultravioletter Fluoreszenzanregung und bei der Fluoreszenzmikroskopie, da dort höhere Strahlungsleistungen verwendet werden. Die Kenntnis der wirklichen Strahlungsdosis und -leistung eröffnet die Möglichkeit, die eigentliche UV-Wirkung einzuschätzen und Ergebnisse unterschiedlicher Setups zu vergleichen.

#### 6.2.4 Feldeinfluss reduziert UV-bedingten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration

Versuche zur Stimulation mit höherfrequenten Wechselfeldern, die unter geringer UVA-Belastung durchgeführt wurden, zeigten während und nach der Befeldung immer niedrigere mittlere Kalziumkonzentrationen als die entsprechenden Kontrollen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der UV-bedingte Kalziuminflux durch die Feldwirkung reduziert wird. Unter erhöhter UVA-Belastung traten Verteilungsunterschiede schon eher auf, jedoch sind die mittleren Kalziumkonzentrationen nicht in allen Feldgruppen niedriger als in den Kontrollen. Insbesondere in der Gruppe 30 kHz findet man deutliche Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe. Das spricht dafür, dass der dosisabhängige UV-Effekt in diesen Versuchen so groß ist, dass er durch die Feldwirkung nicht mehr ausreichend unterdrückt werden kann. Unter normaler UVA-Belastung bzw. in frühen Phasen des Experiments kann daher vermutet werden, dass das Feld die Zelle vor weiterer oxidativer Schädigung schützen kann [234; 237-240]. Diese Wirkung könnte z.B. durch Inaktivierung von Kalziumkanälen oder eine erhöhte Pumpleistung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zum Tragen kommen.

#### 6.2.5 ROS-Konzentrationen sind mit Frequenz korreliert

Man muss davon ausgehen, dass das Gleichgewicht reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies extrem wichtig für die normale Zellfunktion ist. Das schließt die Kontrolle des Redoxstatus und zellulärer Signale ebenso ein wie die Aktivierung von Transkription und Genexpression.

Intrazelluläre Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-H<sub>2</sub>DCFDA ergaben, dass sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration und der Redoxstatus der Zellen tendenziell ähnlich verhalten. Niederfrequente Felder bewirken eine Erhöhung beider Fluoreszenzintensitäten, insbesondere im mittleren Feldstärkebereich. Höherfrequente modulierte Felder hemmen den Anstieg während der Feldapplikation und erhöhen ihn nach der Applikation. Im höheren Frequenzbereich konnten wir eine schwach signifikante Korrelation von intrazellulärer Kalziumkonzentration und Redoxstatus nachweisen, die aber im niederfrequenten Bereich noch nicht signifikant ist. Die Methode erwies sich jedoch als relativ unsicher, da die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität nur gering waren. Selbst bei positiven Kontrollen, denen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Medium zugesetzt wurde, stieg die Intensität nur um 10%. Änderungen, die durch das applizierte Feld verursacht wurden, erreichten selten 5%. Gleichzeitig war die Streubreite aller Einzelzellen recht groß. Daher sind aus diesen Versuchen kaum vertrauenswürdigen Aussagen zu erhalten, obwohl der U-Test teilweise statistisch signifikante Effekte bescheinigt.

Auch die extrazellulären Messungen von Nitrit und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> waren mit gewissen methodischen Schwierigkeiten behaftet. Durch die Bestimmung der Nitritkonzentration, die direkt mit der NO-Produktion verknüpft ist, sollten Aussagen zur Aktivität der zellulären NO-Synthase ermöglicht werden. Unsere Messungen ergaben sowohl für die Nitrit- als auch für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration eine Korrelation mit der Frequenz. Für die Nitritkonzentration konnte ferner ein Zusammenhang mit der angelegten Elektrodenspannung und der Pulsdauer nachgewiesen werden. Im Frequenzbereich oberhalb 1 kHz werden an den Elektroden keine reaktiven Stickstoffverbindungen mehr gebildet. Trotzdem beobachtet man gegenüber der Kontrolle geringere Konzentrationen, die mit Ausnahme von 20 kHz im gesamten Frequenzbereich relativ gleichmäßig ist. Das deutet darauf hin, dass entweder die NO-Produktion unter Feldeinfluss vermindert wird oder Nitrit/Nitrat in die Zelle transportiert wird. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Lohmann et al. [151]. Die Abnahme der Nitritkonzentration könnte durch die Beeinflussung von Anionentransportern oder der Enzymkinetik hervorgerufen werden. So würde z.B. die Hemmung der NO-Synthase das intrazelluläre Gleichgewicht der ROS stören.

Untersuchungen an synchronisierten Zellen zeigten, dass die stärksten Effekte in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase auftraten. Dieses Ergebnis passt gut zur gefundenen zellzyklusabhängigen UV-Empfindlichkeit, die ebenfalls in diesen Phasen maximal war. Durch den Vergleich verschiedener Zelltypen konnte gezeigt werden, dass der Effekt auf die Nitritkonzentration nicht zellspezifisch ist, sondern in Qualität und Intensität gleichwertige Ergebnisse liefert.

Im Bereich unterhalb 1 kHz zeigte sich allerdings, dass nach 30-minütiger Befeldung die Nitritkonzentration in reinem Medium und in der Zellkultur etwa gleich groß und gegenüber der

Kontrolle erhöht ist. Bei den meisten Frequenzen ist aber die Konzentration in der Zellkultur geringfügig höher als in reinem Medium. Das impliziert, dass dieser Effekt eher auf Elektrodenprozesse als auf zelluläre Reaktionen zurückzuführen ist. Jedoch ist die Kinetik der Konzentrationsänderung in diesen beiden Ansätzen verschieden. In reinem Medium nimmt mit zunehmender Befeldungsdauer die Nitritkonzentration gleichmäßig zu, in der Zellkultur misst man einen S-förmigen Verlauf. Das könnte darauf hindeuten, dass es einen zellulären Verstärkungsmechanismus gibt, der bei geringfügig erhöhter Konzentration eine verstärkte NO-Synthese initiiert.

Messungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ergaben ein ähnliches Verhalten. Im unteren Frequenzbereich wurde die Konzentration durch das Feld frequenzabhängig erhöht, im oberen Bereich gleichmäßig vermindert. Jedoch war hier der Effekt an primären Osteoblasten stärker als bei Osteosarcomazellen. Die Richtung dieses Effekts und die Tatsache, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Membran nicht permeieren kann, weist darauf hin, dass unter dem Einfluss höherfrequenter Wechselfelder die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion gegenüber der Kontrolle abnimmt. D.h. das Feld hätte eine gewisse Schutzfunktion gegen ROS und dieser Mechanismus würde auch unabhängig von der in Kap. 6.2.4 erwähnten UV-Belichtung stattfinden, da in diesen Versuchen kein UV-Licht verwendet wurde.

Diese protektive Wirkung höherfrequenter Wechselfelder hatte sich in den vorgestellten Kalziummessungen bereits angedeutet und wird nun durch die Ergebnisse zur ROS-Konzentration bestätigt. Da die NO-Produktion von Osteoblasten durch PKC moduliert werden kann [241], welche wiederum durch intrazelluläres Kalzium aktiviert wird, lassen sich die gefundenen Kalzium-Effekte mit der veränderten Nitritkonzentration verbinden.

Im Zusammenhang mit einer kurzen Gleichstrom-Stimulation berichteten Sauer et al. auch von einer erhöhten Superoxidproduktion [242]. Andererseits fand Sontag [243] keinen Einfluss niederfrequenter elektrischer Felder auf die ROS-Produktion. Daher kann zumindest für die niederfrequente Stimulation nicht eindeutig entschieden werden, ob es sich bei den beobachteten ROS-Effekten um primäre Feldwirkungen handelt, oder um die Wirkung von Elektrolyseprodukten, die über einen zellulären Verstärkungsmechanismus zur weiteren ROS-Produktion führt.

### 6.2.6 ROS-Artefakte durch Elektroden im ELF-Bereich

Die Bewertung der Ergebnisse zum Redoxstatus der Zelle ist jedoch schwierig, da im niederfrequenten Bereich Elektrodenprozesse sehr stark an deren Zustandekommen beteiligt waren. Dies gilt aber nicht im hochfrequenten Bereich und selbst dort wurden Effekte auf die Konzentration von Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$  gefunden. Obwohl auch von Jacobson-Kram et al. [244] berichtet wurde, dass PEMF, welche zur Knochenstimulation genutzt werden, weder zytotoxisch, noch mutagen oder transformierend sind, sollten die Artefakte der elektrischen Stimulation im ELF-Bereich nicht unterschätzt werden. Redoxreaktionen an den Elektroden können dazu führen, dass es besonders in Protein bzw. Aminosäuren enthaltenden Elektrolyten zu einer Anhäufung von Stickoxiden und anderer reaktionsfreudiger Verbindungen kommt, die den Stoffwechsel und die Signalübertragung der Zelle beeinflussen können.

Die Nitrit- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messungen demonstrieren, dass die Gesamtkonzentration an ROS durch die niederfrequente Feldapplikation mittels Elektroden signifikant erhöht sein kann. Es ist jedoch anzunehmen, dass die lokalen Konzentrationen direkt an den Elektroden noch höher liegen. Da die Wirkung der Elektrolyseprodukte in der unmittelbaren Nähe der Elektroden proliferationshemmend bzw. apoptotisch sein kann, lassen sich auf diese Weise auch Nekrosen und andere unerwünschte Nebenwirkungen erklären wie sie u.a. bei Langzeitstimulationen im Gehirn auftreten [163; 164].

Durch Abschätzung der Diffusionsstrecken einzelner, leicht diffusibler Reaktionsprodukte (Kap. 1.2.3) lässt sich – zumindest für die hier vorgestellten Versuche an Einzelzellen – ein Einfluss der Elektrolyseprodukte als wenig wahrscheinlich ausschließen. Für die Versuche an Zellpopulationen, die in kleineren Kammern und mit einer längeren Befeldungsdauer durchgeführt wurden, lässt sich das leider nicht sagen. Zudem wird man hier, durch die Messung der Gesamtpopulation, einen Nettoeffekt erfassen, der sich aus den Extremwerten direkt an den Elektroden und moderaten Werten zwischen den Elektroden zusammensetzt.

### 6.2.7 Feldeffekt auf cGMP und PGE<sub>2</sub>, jedoch nicht auf cAMP

Unsere Experimente zeigen, dass neben Kalzium mindestens ein weiterer „second messenger“ an der Vermittlung der Feldwirkung beteiligt ist. Es existiert also eine Verknüpfung zwischen verschiedenen Signalwegen.

Wir fanden, dass nach hochfrequenter elektrischer Stimulation von Osteosarcomazellen nahezu im gesamten Frequenzbereich eine geringe Erhöhung der cAMP-Konzentration auftrat, die jedoch aufgrund großer Varianzen kaum statistisch signifikant war. Primäre Osteoblasten waren prinzipiell schlechter stimulierbar und reagierten nur bei ausgewählten Frequenzen mit einer minimalen Erhöhung der cAMP-Konzentration, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Ein Unterschied in der Wirkung reiner Sinusfelder und amplitudenmodulierter Sinusfelder konnte nicht festgestellt werden.

Jedoch variieren die publizierten Ergebnisse in Bezug auf eine feldinduzierte Beeinflussung der cAMP-Konzentration. Einige Studien fanden eine leichte Erhöhung [122; 245; 246], andere Arbeitsgruppen fanden dagegen keinen Effekt [123].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde von Long et al. [136] eine positive Wirkung elektromagnetischer Felder auf die cAMP-Konzentration von Osteoblasten (UMR-106) festgestellt. Die unter Feldeinfluss erhöhte Nukleotidkonzentration führte in verschiedenen Zelltypen zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A [247]. Abhängig von der Modulationsfrequenz fanden auch Sontag et al. [248] Veränderungen der Konzentration von cAMP und cGMP, jedoch wurden weder die Kalziumkonzentration noch der Redoxstatus beeinflusst. Dagegen zeigten Chiono et al. [249], dass in nicht erregbaren Zellen die cAMP-Synthese durch den Kalziuminflux reguliert wird. Diffuse Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration haben diese Wirkung allerdings nicht. Das deutet darauf hin, dass spezielle Kalziumkanäle mit der Kalzium-abhängigen Adenylatcyclase verknüpft sein könnten. Dass der Effekt auf die cAMP-Synthese abhängig von der Kinetik der intrazellulären Kalziumkonzentration ist, lässt folgende Vermutung zu. Vorausgesetzt, die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wäre das primäre Ereignis, könnte Kalzium die cAMP-Produktion aktivieren. Jedoch wären vermutlich nur Kalziumpeaks in der Lage, eine Erhöhung der Nukleotidkonzentration hervorzurufen. Diese treten v.a. in der S-Phase auf. Da der Anteil der S-Phasen in einer normalen Population nur 20-30% beträgt, und demzufolge nur in dieser Subpopulation die Adenylatcyclase aktiviert wird, könnte das erklären, dass in der cAMP-Konzentration kein messbarer Effekt auftritt. Da die Proliferation durch cAMP gehemmt würde [93], sind die Messungen von cAMP und Proliferation konsistent. Es wäre aber möglich, dass sich die cAMP-Konzentration im niederfrequenten Bereich anders verhält, da dort keine Stimulation der Proliferation gefunden wurde.

Anders als cAMP scheint die intrazelluläre cGMP-Konzentration einer der empfindlichsten Parameter für die elektrische Stimulation von Zellen zu sein. Auch hier ist die Wirkung auf Osteosarcomazellen stärker als auf Osteoblasten. Man beobachtet ein ähnliches Verhalten über den Frequenzbereich wie in der cAMP-Konzentration. Mit Ausnahme des mittleren Frequenzbereichs erfolgt eine Erhöhung der Konzentration. Diese ist für HOS-Zellen im oberen Frequenzbereich maximal.

Die erhöhte cGMP-Konzentration könnte verschiedene NO-induzierte Effekte vermitteln und so für eine langandauernde Wirkung dieses kurzlebigen Moleküls sorgen. Dazu zählt u.a. die Modulation der Aktivität von Proteinkinase B (Akt) und ERK1/2 bzw. die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> [250]. Über die Freisetzung von NO und PGE<sub>2</sub> können auch benachbarte Zellen stimuliert werden und zu einer Verstärkung des Effektes beitragen.

In einzelnen Versuchsgruppen und auch nur mit geringer Signifikanz konnten wir die Beteiligung von PGE<sub>2</sub> ebenfalls nachweisen. Die Prostaglandinkonzentration wurde 6 Stunden nach elektrischer Stimulation gemessen. Dieses Zeitschema orientiert sich an den Ergebnissen von Nauman et al. [185], die 6 Stunden nach mechanischer Stimulation ein Maximum in der PGE<sub>2</sub>-Synthese fanden. Aussagen über die Kinetik der PGE<sub>2</sub>-Synthese können aufgrund dieser Messungen nicht gemacht werden. Daher ist es nicht sicher, ob das gewählte Zeitfenster wirklich optimal war, um mögliche Feldeffekte zu erfassen.

Nach hochfrequenter elektrischer Stimulation wurde sowohl an Osteosarcomazellen als auch an Osteoblasten eine leichte Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Freisetzung beobachtet. Signifikant ist dieses Ergebnis für 100 kHz und für amplitudenmodulierte 3 kHz. Entsprechende Ergebnisse wurden unter PEMF-

Einfluss bereits für Osteoblasten-Vorläuferzellen [125; 141] und die Osteoblasten-ähnlichen Zelllinien MG-63 [135] und TE 85 [112; 115] gefunden. Das beinhaltete Experimente mit direkter [245], induktiver und kapazitiver Stimulation [137]. Jedoch wurde in diesen Experimenten ausschließlich mit niederfrequenten Feldern gearbeitet, so dass ein direkter Vergleich der Wirkung auf PGE<sub>2</sub> nicht möglich ist. Außerdem muss man davon ausgehen, dass die Wirkungsmechanismen im niederfrequenten und höherfrequenten Bereich verschieden sind.

Obwohl von Lohmann et al. [151] angenommen wird, dass die PLA<sub>2</sub> ein Angriffspunkt der PEMF-Wirkung ist, da sie das Substrat für die Cyclooxygenase und damit die Prostaglandinsynthese bereitstellt, lassen unsere Ergebnisse aufgrund der geringen Signifikanz nicht auf eine herausragende Bedeutung von PGE<sub>2</sub> bei der Vermittlung der Wirkung höherfrequenter Felder schließen.

Insgesamt finden sich in der Literatur nur relativ wenige Arbeiten, in denen die Prostaglandinsynthese in Zusammenhang mit der Feldapplikation untersucht wurde [135]. Ergebnisse existieren v.a. in Verbindung mit einer mechanischen Stimulation. Letztere kann über den ERK1/2 Signalweg eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Produktion hervorrufen [99]. Die Prostaglandinsynthese kann auch durch PKC aktiviert werden, welche wiederum ein Target der Kalziumkaskade ist. Damit besteht eine Verbindung zwischen den hier beobachteten Kalziumeffekten und der PGE<sub>2</sub>-Konzentration.

### 6.2.8 Transiente Aktivierung der MAPK

Die Untersuchungen zeigten, dass die elektrische Stimulation durch verschiedene Feldformen und Frequenzen den Aktivierungsstatus der MAPK beeinflusst. Das zeitliche Verhalten der MAPK-Aktivierung ist schnell und transient; die Aktivierung war nach etwa 30 Minuten maximal und nach 2 Stunden war sie auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Katz et al. [251], die im Anschluss an Verletzungen von Knochen in Osteoblasten die transiente Aktivierung von ERK1/2 beobachteten. Das Signal konnte auch durch konditioniertes Medium weitergegeben werden, d.h. autokrine und parakrine Mechanismen waren an der Verletzungsreaktion beteiligt. Passend zu diesen Ergebnissen fanden Hatton et al. [252], dass auch ein mechanischer Puls über die Aktivierung von ERK1/2 zu Wachstum und Genexpression in Osteoblasten führen kann. Der Effekt auf die MAPK wurde auch von diesen Autoren als kurzzeitig beschrieben.

Die aktivierte Form der MAPK fand sich auch in den unbehandelten Kontrollen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, was auf eine hohe Grundaktivität hinweist. In ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>) als auch in stimulierten Zellen existiert ein konstanter Austausch von MAPK zwischen Zytoplasma und Zellkern [253]. Außerdem gibt es auch in den Kontrollen einen Anteil aktivierter Zellen. Das gilt besonders für die Osteosarcomazellen, ist jedoch bei Tumorzellen auch zu erwarten. Diese normale Aktivität könnte erklären, warum die Ergebnisse für HOS TE85 mehr variieren als für Osteoblasten.

In allen untersuchten Präparaten von Osteoblasten war die Wirkung von Mitogen bzw. Feldapplikation geringer als bei Osteosarcomazellen. Außerdem war weder eine Abhängigkeit der Aktivierung von der Zelldichte bzw. der Entfernung zu Nachbarzellen, noch von der Zellgröße und Strukturierung nachweisbar. Damit kann kein Zusammenhang zum Zellstatus hergestellt werden.

Die hohe Grundaktivität der Osteosarcomazellen ist auch die Ursache für die geringe Stimulation durch PMA, die darum weniger in einer Verschiebung der Gesamtverteilung als in einer qualitativen Veränderung der Fluoreszenz sichtbar wurde. In der Mehrheit der Zellen erfolgt eine Umverteilung der Fluoreszenzintensität. In nicht aktivierten Zellen bildet die MAPK-Fluoreszenz im Zytoplasma eine körnige Struktur, nach Aktivierung erscheint die Fluoreszenz diffus. Das spricht dafür, dass sich die Verteilung der aktivierten MAPK im Zytoplasma geändert hat und diese zunehmend in den Zellkern transportiert wird.

Im Fall von Osteosarcomazellen bewirkt die Befeldung heterogene Ergebnisse in Bezug auf die MAPK. Die Applikation von niederfrequenten Feldpulsen (1.5 Hz) und hochfrequenten Sinuswellen (3 kHz) führt zu einer Aktivierung des Zellkerns durch die Translokation der MAPK. Im Gegensatz dazu bewirkte die Befeldung mit 16 Hz Sinuswellen oder 16 Hz amplitudenmodulierten Sinuswellen von 3 kHz eine Verarmung der MAPK im Zellkern. Letzteres spricht für eine verstärkte Inaktivierung von MAPK im Zellkern, was zu einer Hemmung von Proliferation und/oder Differenzierung führen könnte. Obwohl solch ein Effekt in den Kalziumergebnissen nicht sichtbar ist, wurde bereits auf Literatur, die der Frequenz 16Hz eine besondere Bedeutung zuspricht, verwiesen. Higuchi et al. [104] fanden, dass

bei kontinuierlicher Hemmung der MAPK die Differenzierung von Osteoblasten und die Matrixmineralisation gefördert wird. Außerdem ist bekannt, dass die MAPK nach Aktivierung und Translokation in den Zellkern dort inaktiviert oder sequestriert und somit beendet wird [253]. Jedoch benötigt die Stimulation der Proliferation eine langdauernde Akkumulation von aktiver MAPK im Zellkern, die bis zu 6 Stunden während der Progression durch die G<sub>1</sub>-Phase anhalten muss. Nur die Stimulation durch Mitogene kann solche Langzeitaktivierung auslösen, bei nicht mitogener Stimulation nimmt das Kernsignal nach 10-15min wieder ab [253].

Bei primären Osteoblasten wird die Auswertung oft durch eine unspezifische Anfärbung des Zytoskeletts und matrixhaltiger Vesikel erschwert, die Intensitätsunterschiede zwischen Kern und Zytoplasma verschmieren können. In allen Feldgruppen und nach Stimulation durch PMA erhöht sich die MAPK-Aktivität der Zellen. Der Effekt ist in den Gruppen 3 kHz Sinuswellen und 1.5 Hz Feldpulsen am stärksten ausgeprägt.

Die ERK1/2-Kaskade kann u.a. die ALP-Aktivität und die Mineralisation negativ regulieren [254]. Das deckt sich mit der Beobachtung von Kozawa et al. [255], dass ERK1/2 die Osteocalcinsynthese, die charakteristisch für die Mineralisation ist, negativ reguliert. Diese Ergebnisse konnten durch unsere eigenen Messungen der ALP-Aktivität bestätigt werden.

## **6.3 Der Einfluss elektrischer Stimulation auf Proliferation und Differenzierung**

### **6.3.1 Proliferation und ALP-Aktivität sind mit Stimulationsfrequenz korreliert**

Der Einfluss elektrischer Stimulation auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Knochenzellen wurde über die zeitabhängige Messung von DNA-Gehalt und ALP-Aktivität untersucht. Die ALP-Aktivität ist invers mit dem Zellwachstum korreliert. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die ALP-Aktivität im Knochen ein Maß für die Knochenbildungsrate darstellt [103; 104]. Farley et al. [61] fanden, dass sich die ALP Aktivität umgekehrt proportional zur extrazellulären Kalziumkonzentration verhält. Auch zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration bzw. dem Kalziumflux und der Proliferation wird in der Literatur relativ oft eine Verbindung gezogen [105-107]. Z.B. sollen nach Cai et al. [108] Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration als Reaktion auf eine veränderte extrazelluläre Konzentration die Ursache für Veränderungen in Zellzyklus und Proliferation sein.

In der umfangreichen Literatur zur Feldwirkung auf Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten finden sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse. So fanden Wiesmann et al., dass ein kapazitiv eingekoppeltes elektrisches Feld von 16 Hz die Proliferation erhöht und die Mineralisation beschleunigt [110; 134; 139]. Mit einer ähnlichen Applikationseinrichtung konnte sowohl die DNA-Synthese, als auch die Konzentration von cAMP erhöht werden [256; 257]. Dieser Effekt war von einem erhöhten Kalziuminflux begleitet [258]. Die Gruppe um Lohmann beschrieb jedoch für eine induktive Einkopplung Wachstumshemmung und Erhöhung der ALP-Aktivität [125; 135]. McLeod et al. [144] berichteten dagegen von einer Förderung der Proliferation und Herabsetzung der ALP-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit mechanischer Stimulation gefunden [259].

Aus den hier durchgeführten Experimenten ergibt sich, dass sowohl die Proliferation als auch die ALP-Aktivität mit der Stimulationsfrequenz korreliert sind. Dabei ist der beobachtete Effekt zwischen dem 5. und 10. Tag nach der Feldapplikation maximal. Bei niedrigen Frequenzen findet eine Wachstumshemmung statt, gleichzeitig ist die ALP-Aktivität erhöht. Im hochfrequenten Bereich beobachtet man das entgegengesetzte Verhalten. Der Umkehrpunkt, d.h. der Bereich in dem kein Effekt ausgelöst wird, liegt zwischen 100 Hz und 1 kHz. Einzelne herausragende Frequenzen bzw. Fenstereffekte waren nicht nachweisbar.

Bei längerer Kultivierung werden die beobachteten Unterschiede zu den Kontrollen zunehmend kompensiert und sind dann nicht mehr signifikant. Offensichtlich wird die Wachstumskurve der stimulierten Zellen dahingehend verändert, dass der Anteil der Zellen, die sich aktiv vermehren,

moduliert wird. Das kann durch zusätzliche Aktivierung von Zellen der G<sub>0</sub>-Phase oder Verzögerung beim Passieren der Zellzyklus-Kontrollpunkte erfolgen.

Prinzipiell wurde ein ähnliches Verhalten der verschiedenen Zelltypen nach der Feldapplikation festgestellt. Bestehende Unterschiede können durch die verschiedenen Arten und Zelltypen verursacht sein. Jedoch waren an Osteosarcomazellen stärkere Effekte zu verzeichnen als an primären Osteoblasten. Diese verschiedenen starken Feldeffekte können durch unterschiedlich lange Verdopplungszeiten der beiden Zelltypen begünstigt werden. Angenommen das elektrische Feld übt in erster Linie einen kurzfristigen Effekt aus, könnte sich dieser bei schnell proliferierenden Zellen deutlicher durchsetzen. Es wäre auch vorstellbar, dass bei einem zu lang dauernden Zellzyklus kurzfristige Änderungen verschmiert werden.

Da die Kulturen primärer Osteoblasten nur sehr langsam wachsen, kann man weiterhin vermuten, dass innerhalb der Beobachtungsdauer der Einschaltzeitpunkt für die Differenzierung noch nicht erreicht wurde. Darauf deuten gleichmässige und immer gleichgerichtete Unterschiede zur Kontrolle hin.

Unseren Ergebnissen im niederfrequenten Bereich vergleichbar sind die Arbeiten von Lohmann et al. [125; 135]. Ähnliche Ergebnisse unter dem Einfluss hochfrequenter Stimulation fanden Lorich et al. [137]. Ein Sinusfeld von 60 kHz induzierte eine verstärkte Proliferation von Osteoblasten. Die Wirkung wurde über spannungsabhängige Kalziumkanäle, die Aktivierung von PLA<sub>2</sub> und Calmodulin sowie die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> vermittelt. Da die Zellproliferation durch cAMP gehemmt würde [93], jedoch kein cAMP-Effekt, aber erhöhte Proliferation gefunden wurde, befinden sich die Ergebnisse von cAMP und Proliferation in guter Übereinstimmung.

Die gegensätzliche Wirkung von hoch- und niederfrequenter Befeldung auf Proliferation und Differenzierung eröffnet in der therapeutischen Anwendung die Möglichkeit, die Richtung, in der das Knochengewebe beeinflusst wird, zu kontrollieren.

### 6.3.2 Konditioniertes Medium wirkt entgegengesetzt zu elektrischem Feld

Das Verhalten von Zellen, die ausschließlich mit befeldetem Medium in Kontakt waren, steht im Kontrast zu dem direkt befeldeter Zellen und ermöglicht es, den Einfluss langlebiger Elektrolyseprodukte von der Wirkung des elektrischen Feldes zu trennen. Im Frequenzbereich oberhalb 1 kHz, wo erwartungsgemäß keine Elektrolyseprodukte mehr im Medium nachweisbar sind, ist weder auf die Proliferation noch auf die Differenzierung von HOS-Zellen eine Wirkung zu verzeichnen. Diese Schwelle entspricht aber auch der oben beschriebenen „Nullstelle“ für die Feldwirkung. Im unteren Frequenzbereich <1 kHz verursachen jedoch die chemischen Veränderungen im Medium, welche die direkte Folge des elektrischen Stroms sind, einen der Feldwirkung entgegengesetzten Effekt. Die Proliferation wird gefördert, die ALP-Aktivität herabgesetzt. Das spricht zum einen dafür, dass die Produkte der an den Elektroden ablaufenden Reaktionen selbst in der Lage sind, das Verhalten der untersuchten Zellen zu beeinflussen. Andererseits zeigt die gegensätzliche Wirkung von elektrischem Feld und Elektrolyseprodukten, dass es sich bei den beschriebenen Ergebnissen wirklich um feldbedingte Effekte und nicht nur um methodisch verursachte Nebenwirkungen handelt. Von einer Beteiligung elektrochemischer Reaktionsprodukte am Zustandekommen der Gesamtwirkung ist im niederfrequenten Bereich jedoch auszugehen. Dafür spricht auch die Korrelation von Nitrit und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit der Stimulationsfrequenz.

Außerdem könnte die ungleiche Wirkung von elektrischem Feld und konditioniertem Medium durch Unterschiede in der lokalen und Gesamtkonzentration von elektrolytisch entstandenem NO oder anderen ROS verursacht sein. In konditioniertem Medium sollte die NO-Konzentration geringer sein, da das Medium durchmischt wurde bzw. vorhandenes NO z.B. zu Nitrit/Nitrat weiterreagiert. Direkt an den Elektroden können jedoch hohe lokale Konzentrationen entstehen, die die Zellen lokal beeinflussen können. Durch Diffusion würden sich die Reaktionsprodukte in der gesamten Kammer ausbreiten, allerdings würde die Konzentration dort nur langsam zunehmen und insgesamt gering bleiben, so dass lokal gegensätzliche Effekte auftreten könnten. Die Gesamtwirkung sollte dann abhängig davon sein, welcher Effekt überwiegt. Da insbesondere die Wirkung von NO auf die Proliferation konzentrationsabhängig und biphasisch ist, d.h. langsame, geringe NO-Freisetzung stimuliert Wachstum und ALP-Aktivität, wogegen schnelle, extreme Freisetzung die Proliferation

hemmt und Apoptose bewirkt, könnten unterschiedliche Konzentrationen eine plausible Erklärung für den oben beschriebenen Effekt liefern.

Da der Einsatz von Elektroden für die niederfrequente elektrische Stimulation mit elektrochemisch bedingten Nebenwirkungen verbunden ist, sind die Wahl der Applikationsanordnung und der eingesetzten Stromdichte von großer Bedeutung. Eine mit unserem Setup vergleichbare Elektrodenanordnung wurde von Tang et al. benutzt. Sie fanden zwischen 1 und 1000 Hz eine Proliferationssteigerung mit einem Maximum bei ca. 10 Hz. Nach Exposition gab es einen erhöhten Anteil an S-Phasen und eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration [260]. Auch unter dem Einfluss von Gleichspannung wurden solche Effekte beschrieben [106; 261]. Selbst bei sehr hohen elektrischen Feldstärken (3.2 kV/m) konnte von Ozawa et al. [107] ein positiver Effekt auf Kalziuminflux und Proliferation festgestellt werden. Entsprechende Resultate konnten von uns nur bei der Behandlung der Zellen mit konditioniertem Medium beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch häufig nach kapazitiver oder induktiver Stimulation gefunden. Jedoch sind dort die verwendeten Feldstärken wesentlich niedriger und ein direkter Vergleich daher nicht möglich.

## 6.4 Abhängigkeit der Feldwirkung vom Zellstadium

Bereits seit einiger Zeit ist bekannt, dass bei der Steuerung von Zellzyklus und Wachstum Kalzium eine wichtige Rolle spielt. Insbesondere die Übergänge  $G_1/S$  und  $G_2/M$  benötigen hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen [65]. Aber auch andere Zelleigenschaften sind von der individuellen Phase des Zellzyklus bzw. dem Entwicklungsstand abhängig. Dazu zählen die Expression von ALP [54], spannungsabhängigen Ionenkanälen [57] bzw. Kalziumkanälen [58], die zelluläre Reaktion auf Vitamin D, Glucocorticoide [56; 262],  $PGE_2$  und Parathyroidhormon [263], die Expression des Vitamin D Rezeptors [264] sowie die intrazelluläre Kalziumkonzentration [65] und die Aktivität der Kalziumfreisetzung [69].

Diese zellzyklusabhängigen Eigenschaften tragen dazu bei, dass man in unsynchronisierten Kulturen, insbesondere bei Messungen auf Einzelzellniveau, zu heterogenen Ergebnissen gelangt. Außerdem legt es nahe, dass nur bestimmte Zellzustände sensibel für externe Reize sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass nur ein geringer Anteil der Zellen auf ein elektrisches Feld reagiert. Um Veränderungen innerhalb von Subpopulationen zu erfassen, ist eine Analyse der Verteilung aufschlussreich wie sie im Fall von Kalzium, Redoxstatus und MAPK-Aktivität vorgenommen wurde. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden daher in unseren Versuchen alle bekannten Einflussfaktoren konstant gehalten. Unterschiede in Zelldichte- und -zustand sowie Zusammensetzung der Lösung können aber eine mögliche Ursache für verschiedene Ergebnisse aus unterschiedlichen Arbeitsgruppen darstellen.

Auch in den umstrittenen Arbeiten von Lindström et al. [265; 266] konnten die Autoren nur an morphologisch vorausgewählten Zellen Kalziumpeaks als Antwort auf ein externes Feld nachweisen. Diese Ergebnisse konnten von anderen Gruppen, die beliebige Zellen auswählten und über große Zellzahlen mittelten, nicht reproduziert werden. Sontag [243] erklärt die z.T. widersprüchlichen Effekte, die in verschiedenen Labors gefunden wurden, ebenfalls mit den speziellen zellulären Bedingungen. Die Zelle kann entweder aktiviert oder im Ruhezustand vorliegen und ein möglicher Effekt an einen bestimmten Status und eine bestimmte Zelllinie gebunden sein [267; 268]. So soll die Feldapplikation in früheren Stadien effektiver sein [130; 141]. Das steht eventuell im Zusammenhang mit dem zeitlichen Muster der Kollagenexpression, welche während der Proliferation hochgeregt und während der nachfolgenden Differenzierung heruntergeregt wird. Das könnte auch erklären, weshalb der stimulatorische Effekt unabhängig von der Stimulationsdauer ist.

Unsere Messungen zeigten, dass insbesondere Kalziumsignale stark vom Zellzyklus abhängen, was die große Heterogenität in den beobachteten Zellreaktionen erklären kann. Während in unsynchronisierten Zellen nur wenige und heterogene Reaktionen auf ein äußeres Feld beobachtet wurden, traten während der frühen S-Phase überwiegend intrazelluläre Kalziumpeaks auf. Außerdem war der Anteil reagierender Zellen in dieser Phase viel höher. Proliferation und ALP-Aktivität werden jedoch durch Stimulation während der S-Phase nicht nachhaltig beeinflusst. Es ist daher anzunehmen, dass die Feldwirkung auf die Kalziumkonzentration während der S-Phase nur kurzfristig



ist und spätestens nach erfolgter Mitose wieder verschwindet. Stärkere Effekte in Proliferation und ALP-Aktivität findet man bei Stimulation während der  $G_0/G_1$ -Phase. Ähnliche Ergebnisse an HOS TE85 fanden auch Kenny et al. [105], die nachwiesen, dass, unabhängig vom Kalziuminflux, nur dann eine Erhöhung der Proliferation stattfindet, wenn die Zellen in  $G_0/G_1$  synchronisiert sind bzw. sich die Mehrzahl der Zellen in dieser Phase befindet.

Zudem erscheint es nicht plausibel, dass allein die Stimulation der Zellen während der S-Phase (ohne parakrine Mechanismen) in der Lage ist, das Wachstum der Population zu verändern. Es ist nicht anzunehmen, dass sich die Verdopplungsdauer der Zellen (Zeit für einen Zyklus) durch äußere Einflüsse verkürzt [53]. Vielmehr wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Population dadurch bestimmt, wie groß der Prozentsatz der aktiv proliferierenden Zellen ist. In einer normalen Population befindet sich immer ein Teil der Zellen in der Ruhephase ( $G_0$ ), d.h. diese Zellen sind durch die äußeren (Nährstoffangebot, Temperatur, Kontakt) und/oder inneren (DNA-Schaden, Differenzierung) Bedingungen vom aktiven Zellzyklus ausgeschlossen. Nur dadurch, dass sich eine größere Anzahl Zellen periodisch verdoppelt, kann die Wachstumsgeschwindigkeit der Population zunehmen. Dafür ist es notwendig, dass die Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, aktiviert werden. Ein Kennzeichen für diesen Ausgang aus der  $G_0$ -Phase ist die Expression des Transkriptionsfaktors *c-myc*. Ein erhöhtes Transkriptionslevel wurde im Zusammenhang mit der Wirkung elektromagnetischer Felder [127; 269; 270] aber auch durch Vibrationskräfte [271] bereits gefunden.

Eine verstärkte Aktivierung von Zellen der  $G_0$ -Phase lässt sich auch aufgrund der hier beobachteten Veränderung in den Wachstumskurven vermuten. Ein entsprechender Hinweis auf die feldinduzierte Rekrutierung von  $G_0$ -Zellen findet sich auch bei Pezzetti et al. [138]. Damit korrespondieren auch die guten Stimulationsergebnisse während der  $G_0$ - und der  $G_1$ -Phase, die in einer verstärkten Proliferation sichtbar wurden. Jedoch konnte durch die Untersuchung von Proliferation und ALP-Aktivität synchronisierter Zellen keine Phase des Zellzyklus als besonders empfindlich für die elektrische Stimulation herausgestellt werden. Für kurzfristige Effekte deuten die Ergebnisse zwar in Richtung S- und  $G_2$ -Phase, aber nach längerer Kultivierung ist in diesen Fällen jeder Effekt verschwunden. Im hochfrequenten Bereich ist der Einfluss auf einzelne Zellzyklusphasen noch weniger nachweisbar. Das impliziert, dass das Zusammenspiel aller Zellzyklusphasen für eine messbare Wachstumsänderung notwendig ist, da erst durch Zell-Zell-Kommunikation (Gap Junctions und parakrine Substanzen) große Teile der Gesamtpopulation rekrutiert bzw. aktiviert werden können. Erst dann lässt sich in Parametern, die über die gesamte Population gemittelt werden, ein Effekt nachweisen.

Bei den Untersuchungen von Proliferation und ALP-Aktivität zeigte sich, dass durch die einmalige Feldapplikation keine langfristige Wirkung hervorgerufen wurde. Die kurzfristige Wirkung des elektrischen Feldes lässt sich dadurch erklären, dass die Entscheidung für eine Zelle, ob sie sich weiter teilt oder in die Ruhephase übergeht, abhängig von den aktuellen Bedingungen (s.o.) bei jedem Zyklusdurchlauf neu getroffen wird. Damit wird klar, dass der primäre Effekt nur für einen oder wenige Zyklen anhalten kann. Die Weitergabe der feldinduzierten Aktivierung über mehrere Zyklen ist nur vorstellbar, wenn dadurch dauerhafte Prozesse, wie die Expression bestimmter regulatorischer Proteine, angeschaltet werden. Das bedeutet, dass die Wirkung der elektrischen Stimulation durch wiederholte Anwendungen verstärkt werden könnte. Für eine optimale Wirkung müsste dann einmal pro Zyklus stimuliert werden. Das wäre z.B. durch tägliche Stimulation wie sie im klinischen Bereich eingesetzt wird, zu erreichen. Für die größere Wirksamkeit mehrmaliger Feldapplikation spricht außerdem, dass der Effekt auf Proliferation und Differenzierung nach einmaliger Feldapplikation relativ gering im Vergleich zu publizierten klinischen Erfolgen ist. Es muss daher einen Verstärkungsmechanismen geben, der bei wiederholter elektrischer Stimulation einsetzt.

Für unbefeldete Osteoblasten wurde gefunden, dass die Bindung an die extrazelluläre Matrix das Wachstum hemmt und die Differenzierung der Zellen fördert [272]. Dementsprechend beobachteten wir nach der elektrischen Stimulation dreidimensionaler Zellverbände, die als Osteocytenmodell dienen können, geringere Effekte auf die Proliferation. Gleichzeitig war die ALP-Aktivität gegenüber der 2D-Kultur und gegenüber den unbefeldeten Kontrollen erhöht. Das lässt darauf schließen, dass durch die Feldwirkung undifferenzierte Zellen bevorzugt zur Teilung stimuliert werden, bei differenzierten Zellen wird jedoch die Matrixbildung gefördert.

## 6.5 Mögliche Mechanismen der Feldwirkung

Es gibt eine Reihe von mehr oder weniger plausiblen Mechanismen, die für die Erklärung der Effekte elektrischer Feldern auf Zellen und Gewebe herangezogen werden. Bislang hat sich jedoch keine dieser Hypothesen als besonders wahrscheinlich durchgesetzt [273]. Aufgrund der dielektrischen Eigenschaften von Zellmembran und Zytoplasma ist das elektrische Feld im untersuchten Frequenzbereich nicht in der Lage, in die Zelle einzudringen. Deshalb muss die Feldwirkung primär durch Membranprozesse vermittelt werden.

Die vorliegenden Daten an Osteosarcomazellen zeigen, dass es unter dem Einfluss elektrischer Felder zu verstärktem Kalziuminflux kommt. Dadurch erhöht sich die intrazelluläre Konzentration. Zusätzlich wird Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, was zu einer sehr plötzlichen und starken Erhöhung der Konzentration (Peaks) führt. Dieser Vorgang könnte durch den Influx von extrazellulärem Kalzium getriggert sein und einen zellulären Verstärkungsmechanismus darstellen. Insbesondere bei niedrigen Frequenzen würden durch die Einwirkung von Dehnung oder Scherstress mechanosensitive Ionenkanäle aktiviert werden; außerdem bewirkt das elektrische Feld eine Änderung des Transmembranpotentials, die spannungsabhängige Ionenkanäle aktivieren kann. Dabei sind insbesondere Kalziumkanäle interessant, da in der Literatur sowohl im Zusammenhang mit der Wirkung elektrischer Felder als auch bei der Vermittlung mechanischer Belastung von verstärktem Kalziuminflux berichtet wurde [274].

Für die Bewertung der elektrischen Stimulation des Knochens ist im Besonderen der Vergleich zu den physiologischen Vorgängen des „Bone Remodeling“ bedeutsam. Demzufolge stellt die feldbedingte Erzeugung einer elektroosmotischen Strömung eine mögliche Erklärung für die Wirkung niederfrequenter Felder dar. Da diese Strömung nur in der elektrischen Doppelschicht auftritt, wäre sie in der Lage, an der Zellmembran einen erheblichen Scherstress zu erzeugen. Dieser könnte wiederum durch mechanosensitive Elemente der Zelle wie Integrine und/oder mechanosensitive Ionenkanäle detektiert werden. Solch ein Mechanismus würde außerdem eine mögliche Verbindung zwischen mechanischer und elektrischer Stimulation, d.h. zwischen natürlichem und artifiziell „Bone Remodeling“ herstellen. Zudem gibt es einige Gemeinsamkeiten zwischen den in der Literatur beschriebenen Wirkungen mechanischer Stimulation und den hier gefundenen Feldeffekten. Dazu gehören der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration [18], die Ausschüttung von  $\text{PGE}_2$  [185], die Aktivierung von PKC, NO-Synthase [275-279] und MAPK [252], sowie die verstärkte Proliferation und herabgesetzte ALP-Aktivität [185]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wäre auch eine Übereinstimmung in Teilen der Signaltransduktion denkbar.

Eine ähnliche Theorie wurde von Pilla unterbreitet. Er geht davon aus, dass die elektromagnetische und mechanische Stimulation sowie Ultraschall einen einheitlichen Wirkmechanismus besitzen, da sie alle vergleichbare Größenordnungen und Zeitverläufe der elektrischen Feldstärke im Gewebe erzeugen [280].

Entsprechend diesem elektrokinetischen Ansatz würde ein elektrisches Wechselfeld vor allem die lokale Dichte von Ionen und Dipolen in der elektrischen Doppelschicht beeinflussen. So könnte die Verfügbarkeit der Ionen für Transportprozesse durch die Membran und somit diese Transportprozesse selbst verändert werden [281]. Besonderes Augenmerk liegt auf den Frequenzen  $< 120 \text{ Hz}$  [32], die entweder direkt oder in Form von Wellenpaketen appliziert werden.

Die gegensätzliche Wirkung von hoch- und niederfrequenter Befeldung auf Proliferation und Differenzierung weist darauf hin, dass in den entsprechenden Frequenzbereichen verschiedene Mechanismen der Feldwirkung überwiegen. Man sollte jedoch grundsätzlich von einem gemeinsamen Effekt mehrerer Signalwege ausgehen. Dafür spricht auch, dass im höherfrequenten Bereich sowohl reine Sinusfelder als auch amplitudenmodulierte Felder eine Wirkung auf die gemessenen Parameter haben. Außerdem können die als Modulationsfrequenz benutzten 16 Hz auch selbst einen Feldeffekt auslösen. Um die Modulationsfrequenz wahrzunehmen, müsste die Zelle die Fähigkeit zur Signaldemodulation besitzen. Eine mögliche biologische Struktur, die zur Demodulation führt, müsste durch ein nicht-lineares Verhalten mit einer Geschwindigkeitskonstante im Bereich der Trägerfrequenz des Feldes charakterisiert sein. So könnte z.B. die Geschwindigkeit molekularer und supramolekularer chemischer Reaktionen beeinflusst werden. Theoretisch könnte dieser Mechanismus bis zu einer Frequenz von maximal 10 MHz effektiv funktionieren. Jedoch sind die Effekte im unteren

Frequenzbereich nicht prinzipiell auf amplitudenmodulierte höherfrequente Signale übertragbar [282-284].

Im oberen Frequenzbereich ist die Beeinflussung der Transportrate von Ionenpumpen und – austauschern zu vermuten. Z.B. kann der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ -Anionenaustauscher durch Kalzium/Calmodulin aktiviert und durch cAMP gehemmt werden [285]. Diese Annahme wird ferner durch feldinduzierte Aktivitätsänderungen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase gestützt [210; 211]. Zur Erklärung dieses Effekts wurde das „electroconformational coupling“-Modell (ECC) entwickelt, das die Verwendung harmonischer Felder im kHz-Bereich präferiert, in dem sich auch die Geschwindigkeitskonstanten zellulärer Transporter befinden.

## Literaturverzeichnis

1. **Wolff J.** Das Gesetz der Transformation der Knochen. *A Hirschwald, Berlin* 1-126, 1892.
2. **Frost HM.** Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): Redefining Wolff's law: The bone modeling problem. *Anat Rec* 226: 403-413, 1990.
3. **Zhang D, Cowin SC and Weinbaum S.** Electrical signal transmission and gap junction regulation in a bone cell network: a cable model for an osteon. *Ann Biomed Eng* 25: 357-374, 1997.
4. **Fukada E and Yasuda I.** On the piezoelectric effect of bone. *J Physical Soc Japan* 10: 1158-1169, 1957.
5. **Bassett CLA and Becker RO.** Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science* 137: 1063-1064, 1962.
6. **Yasuda I.** Piezoelectricity of living bone. *J Kyoto Pref Univ Med* 53: 325, 1953.
7. **Cochran GV, Pawluk RJ and Bassett CA.** Electromechanical characteristics of bone under physiologic moisture conditions. *Clin Orthop* 58: 249-70, 1968.
8. **Schmidt-Rohlfing B, Silny J and Niethard FU.** Pulsierende elektromagnetische Felder in der Behandlung von Verletzungen und Erkrankungen der Bewegungsorgane- eine Übersicht und Metaanalyse. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 138: 379-389, 2000.
9. **Fukada E.** Piezoelectric properties of biological polymers. *Q Rev Biophys* 16: 59-87, 1983.
10. **Williams WS.** Piezoelectric effects in biological materials. *Ferroelectrics* 41: 225-246, 1982.
11. **Anderson JC and Eriksson C.** Electrical properties of wet collagen. *Nature* 218: 166-8, 1968.
12. **Chakkalakal DA.** Mechanoelectric transduction in bone. *J Mater Res* 44: 1034-1046, 1989.
13. **Johnson MW, Chakkalakal DA, Harper RA and Katz JL.** Comparison of the electromechanical effects of dry and wet bone. *J Biomech* 13: 437-442, 1980.
14. **Cerquiglini S, Cignitti M, Marchetti M and Salleo A.** *Life Science* 6: 2651-2666, 1967.
15. **MacGinitie LA.** Streaming and piezoelectric potentials in connective tissues. *Adv Chem Ser* 250: 125-142, 1995.
16. **Cowin SC and Weinbaum S.** Strain amplification in the bone mechanosensory system. *Am J Med Sci* 316: 184-188, 1998.
17. **Antonsson EK and Mann RW.** The frequency content of gait. *J Biomech* 18: 39-47, 1985.
18. **Hung CT, Pollack SR, Reilly TM and Brighton CT.** Real-Time Calcium Response of Cultured Bone-Cells to Fluid-Flow. *Clin Orthop* 256-269, 1995.
19. **Reich KM, Gay CV and Frangos JA.** Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol* 143: 100-104, 1990.
20. **Spadaro JA.** Mechanical and Electrical Interactions in Bone Remodeling. *Bioelectromagnetics* 18: 193-202, 1997.
21. **Pilla AA, Kahn S, Nasser P, Mont M, Kaufmann JJ and Siffert RS.** Low intensity pulsed ultrasound accelerates bone repair in the rabbit fibula. *J Bone Joint Surg* 1989.
22. **Pilla AA, Mont M, Nasser PR, Kahn SA, Figueiredo M, Kaufmann JJ and Stiffert RS.** Non-invasive low intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 4: 246-253, 1990.
23. **Heckmann M, Eberleinkonig B, Wollenberg A, Przybilla B and Plewig G.** Ultraviolet-A Radiation Induces Adhesion Molecule Expression on Human Dermal Microvascular Endothelial-Cells. *Br J Dermatol* 131: 311-318, 1994.
24. **Naruse K, MikuniTakagaki Y, Azuma Y, Ito M, Oota T, Kameyama K and Itoman M.** Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 216-220, 2000.
25. **Harrigan TP and Hamilton JJ.** Bone strain sensation via transmembrane potential changes in surface osteoblasts: loading rate and microstructural implications. *J Biomech* 26: 183-200, 1993.
26. **Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Cane V and Giardino R.** In vitro evaluation of the effects of electromagnetic fields used for bone healing. *Electro and Magnetobiology* 17: 335-342, 1998.
27. **Ciombor DM, Lester G, Aaron RK, Neame P and Caterson B.** Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins. *J Orthop Res* 20: 40-50, 2002.
28. **Lee JH and McLeod KJ.** Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 21: 129-136, 2000.
29. **Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang GH and Pollack SR.** Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am* 83A: 1514-1523, 2001.
30. **Fitzsimmons RJ, Ryaby JT and Farley JR.** Calcium Influx into Human Bone-Cells Was Increased by an Electromagnetic-Field (EMF). *J Bone Miner Res* 8: S361-S361, 1993.
31. **Gonzalezriola J, Pamies JA, Hernandez ER, Revilla M, Seco C, Villa LF and Rico H.** Influence of Electromagnetic-Fields on Bone Mass and Growth in Developing Rats - A

- Morphometric, Densitometric, and Histomorphometric Study. *Calcif Tissue Int* 60: 533-537, 1997.
32. **McLeod KJ and Rubin CT.** Frequency specific modulation of bone adaptation by induced electric fields. *J Theor Biol* 145: 385-96, 1990.
  33. **Friedenberg ZB, Zemsky LM, Pollis RP and Brighton CT.** The response of non-traumatized bone to direct current. *J Bone Joint Surg* 56: 1023-30, 1974.
  34. **Brighton C, Hozack W and Brager M.** Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3: 331-340, 1985.
  35. **Aaron RK and Steinberg M.** Electrical stimulation of osteonecrosis of the femoral head. *Semin Arthroplasty* 2: 214-221, 1991.
  36. **Rubin CT, Donahue HJ, Rubin JE and McLeod KJ.** Optimization of electric field parameters for the control of bone remodeling: exploitation of an indigenous mechanism for the prevention of osteopenia. *J Bone Miner Res* 8: S573-S581, 1993.
  37. **Bassett CA.** The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am* 15: 61-87, 1984.
  38. **Brighton CT, Black J, Friedenberg ZB, Esterhai JL, Day LJ and Connolly JF.** A multicenter study of the treatment of non-union with constant direct current. *J Bone Joint Surg* 63: 2-13, 1981.
  39. **Akai M, Yabuki T, Tateishi T and Shirasaki Y.** Mechanical properties of the electrically stimulated callus. An experiment with constant direct current in rabbit fibulae. *Clin Orthop* 293-302, 1984.
  40. **Colson DJ, Browett JP, Fiddian NJ and Watson B.** Treatment of delayed- and non-union of fractures using pulsed electromagnetic fields. *J Biomed Eng* 10: 301-4, 1988.
  41. **Law HT, Annan I, McCarthy ID, Hughes SP, Stead AC, Camburn MA and Montgomery H.** The effect of induced electric currents on bone after experimental osteotomy in sheep. *J Bone Joint Surg Br* 67: 463-9, 1985.
  42. **Pienkowski D, Pollack SR, Brighton CT and Griffith NJ.** Comparison of asymmetrical and symmetrical pulse wave forms in electromagnetic stimulation. *J Orthop Res* 10: 247-255, 1992.
  43. **McLeod K and Rubin C.** The effect of low-frequency electric fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 74A: 920-929, 1992.
  44. **Bassett CAL.** Beneficial Effects of Electromagnetic Fields. *J Cell Biochem* 51: 387-393, 1993.
  45. **Luben RA.** Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health Phys* 61: 15-28, 1991.
  46. **Renooij W, Janssen LW, Akkermans LM, Lagey CL and Wittebol P.** Electrode-oxygen consumption and its effects on tissue-oxygen tension. A study by mass spectrometry. *Clin Orthop* 239-44, 1983.
  47. **Black J.** Tissue response to exogenous electromagnetic signals. *Orthop Clin North Am* 15: 15-31, 1984.
  48. **Brighton CT and Friedenberg ZB.** Electrical stimulation and oxygen tension. *Ann N Y Acad Sci* 238: 314-20, 1974.
  49. **Hamanishi C, Kawabata T, Yoshii T and Tanaka S.** Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin Orthop* 247-52, 1995.
  50. **Lerner UH.** Regulation of Bone Metabolism by the Kallikrein-Kinin System, the Coagulation Cascade, and the Acute-Phase Reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 481-493, 1994.
  51. **Repke H and Liebmann C.** *Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme.* Berlin: Akademie-Verlag, 1987.
  52. **Muehsam DJ and Pilla AA.** The Sensitivity of Cells and Tissues to Exogenous Fields - Effects of Target System Initial-State. *Bioelectrochem Bioenerg* 48: 35-42, 1999.
  53. **Cheng GM, Liu BF, Yu YJ, Diglio C and Kuo TH.** The Exit from G(0) into the Cell-Cycle Requires and Is Controlled by Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pump. *Arch Biochem Biophys* 329: 65-72, 1996.
  54. **Fedarko NS, Bianco P, Vetter U and Robey PG.** Human Bone Cell Enzyme Expression and Cellular Heterogeneity - Correlation of Alkaline-Phosphatase Enzyme-Activity with Cell-Cycle. *J Cell Physiol* 144: 115-121, 1990.
  55. **Ikegami A, Inoue S and Hosoi T.** Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 135: 782-789, 1994.
  56. **Pockwinse SM, Stein JL, Lian JB and Stein GS.** Developmental Stage-Specific Cellular-Responses to Vitamin-D and Glucocorticoids During Differentiation of the Osteoblast Phenotype - Interrelationship of Morphology and Gene-Expression by in-Situ Hybridization. *Exp Cell Res* 216: 244-260, 1995.

57. **Loza J, Stephan E, Dolce C, Dziak R and Simasko S.** Calcium Currents in Osteoblastic Cells - Dependence upon Cellular Growth Stage. *Calcif Tissue Int* 55: 128-133, 1994.
58. **Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H and Takeshita A.** Cell Cycle-Dependent Expression of L-Type and T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Currents in Rat Aortic Smooth-Muscle Cells in Primary Culture. *Circ Res* 79: 14-19, 1996.
59. **Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, Turner CH, Burr DB, Qiu JY and Duncan RL.**  $\text{Ca}^{2+}$  regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C989-C997, 2000.
60. **Lomri A and Marie PJ.** Changes in Cytoskeletal Proteins in Response to Parathyroid-Hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin-D in Human Osteoblastic Cells. *Bone Miner* 10: 1-12, 1990.
61. **Farley JR, Hall SL, Tanner MA and Wergedal JE.** Specific Activity of Skeletal Alkaline-Phosphatase in Human Osteoblast-Line Cells Regulated by Phosphate, Phosphate-Esters, and Phosphate Analogs and Release of Alkaline-Phosphatase Activity Inversely Regulated by Calcium. *J Bone Miner Res* 9: 497-508, 1994.
62. **Adey WR.** Biological Effects of Electromagnetic Fields. *J Cell Biochem* 51: 410-416, 1993.
63. **Liburdy RP.** Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields - Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett* 301: 53-59, 1992.
64. **Yamaguchi DT, Kleeman CR and Muallem S.** Protein-Kinase C-Activated Calcium-Channel in the Osteoblast-Like Clonal Osteo-Sarcoma Cell-Line Umr-106. *J Biol Chem* 262: 4967-4973, 1987.
65. **Pande G, Kumar NA and Manogaran PS.** Flow Cytometric Study of Changes in the Intracellular Free Calcium During the Cell-Cycle. *Cytometry* 24: 55-63, 1996.
66. **Poenie M, Alderton J, Tsien RY and Steinhardt RA.** Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature* 315: 147-149, 1985.
67. **Steinhardt R and Alderton J.** Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature* 332: 364-366, 1988.
68. **Hepler PK.** The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16: 322-330, 1994.
69. **Kono T, Jones KT, Bosmickich A, Whittingham DG and Carroll J.** A Cell Cycle-Associated Change in  $\text{Ca}^{2+}$  Releasing Activity Leads to the Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  Transients in Mouse Embryos During the First Mitotic Division. *J Cell Biol* 132: 915-923, 1996.
70. **Twigg J, Patel R and Whitaker M.** Translational control of  $\text{InsP}_3$ -induced chromatin condensation during the early cell cycles of sea urchin embryos. *Nature* 332: 366-369, 1988.
71. **Fukayama S, Tashjian AH and Bringhurst FR.** Role of Protein Kinase-A in the Regulation of Cytosolic Free Calcium in Human Osteoblast-Like Saos-2 Cells. *Am J Physiol* 264: C464-C470, 1993.
72. **Ferrier J and Ward A.** Electrophysiological differences between bone cell clones: membrane potential responses to parathyroid hormone and correlation with the cAMP response. *J Cell Physiol* 126: 237-242, 1986.
73. **Ferrier J, Ward-Kesthely A, Homble F and Ross S.** Further analysis of spontaneous membrane potential activity and the hyperpolarizing response to parathyroid hormone in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 130: 344-351, 1987.
74. **Lennon AM, Ramauge M and Pierre M.** Role of redox status on the activation of mitogen-activated protein kinase cascades by NSAIDs. *Biochem Pharmacol* 63: 163-70, 2002.
75. **Saran M, Michel C and Bors W.** Radical functions in vivo: a critical review of current concepts and hypotheses. *Z Naturforsch [C]* 53: 210-27, 1998.
76. **Chakraborti S and Chakraborti T.** Oxidant-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factors in the cardiovascular system: a brief overview. *Cell Signal* 10: 675-83, 1998.
77. **Adler V, Yin ZM, Tew KD and Ronai Z.** Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18: 6104-6111, 1999.
78. **Armour KE and Ralston SH.** Estrogen Up-Regulates Endothelial Constitutive Nitric-Oxide Synthase Expression in Human Osteoblast-Like Cells. *Endocrinology* 139: 799-802, 1998.
79. **Lowik CWGM, Nibbering PH, Vanderuit M and Papapoulos SE.** Inducible Production of Nitric-Oxide in Osteoblast-Like Cells and in Fetal Mouse Bone Explants Is Associated with Suppression of Osteoclastic Bone-Resorption. *J Clin Invest* 93: 1465-1472, 1994.
80. **Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW and Benjamin N.** Nitric-Oxide - A Cytokine-Induced Regulator of Bone-Resorption. *J Bone Miner Res* 10: 1040-1049, 1995.
81. **KleinNulend J, Helfrich MH, Sterck JGH, MacPherson H, Joldersma M, Ralston SH, Semeins CM and Burger EH.** Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 108-114, 1998.

82. **Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandezluna JL and Gonzalezmacias J.** Expression and Functional-Role of Nitric-Oxide Synthase in Osteoblast-Like Cells. *J Bone Miner Res* 10: 439-446, 1995.
83. **Fox SW and Chow JWM.** Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 23: 1-6, 1998.
84. **MacPherson H, Noble BS and Ralston SH.** Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Bone* 24: 179-185, 1999.
85. **Mancini L, Moradibidhendi N, Brandi ML and Macintyre I.** Nitric-Oxide Superoxide and Peroxynitrite Modulate Osteoclast Activity. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 785-790, 1998.
86. **Mancini L, Moradibidhendi N, Becherini L, Martineti V and Macintyre I.** The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 477-481, 2000.
87. **Janssen YMáW, Soultanakis R, Steece K, Heerdt E, Singh RJ, Joseph J and Kalyanaraman B.** Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am J Physiol* 275: 1100-1109, 1998.
88. **Yamaguchi DT, Green J, Merritt BS, Kleeman CR and Muallem S.** Modulation of osteoblast function by prostaglandins. *Am J Physiol* 257: F755-F761, 1989.
89. **Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Fukase M, Kumegawa M and Chihara K.** Prostaglandin E2 stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J Bone Miner Res* 11: 62-71, 1996.
90. **Kaneki H, Takasugi I, Fujieda M, Kiri M, Mizuochi S and Ide H.** Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem* 73: 36-48, 1999.
91. **Raisz LG.** Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 419-421, 1999.
92. **Chyun YS and Raisz LG.** Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins* 27: 97-103, 1984.
93. **Hakeda Y, Kumegawa M, Kurihara N, Maeda N, Natakani Y and Yoshino T.** Prostaglandin-E2 Stimulates DNA-Synthesis by a Cyclic AMP-Independent Pathway in Osteoblastic Clone MC3T3-E1 Cells. *J Cell Physiol* 128: 155-161, 1986.
94. **Ozawa H, Imamura K, Abe E, Takahashi N, Hiraide T, Shibasaki Y, Fukuhara T and Suda T.** Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. *J Cell Physiol* 142: 177-85, 1990.
95. **Garrington TP and Johnson GL.** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-218, 1999.
96. **Davis RJ.** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553-6, 1993.
97. **Kim-Kaneyama, Nose K and Shibnuma M.** Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J Biol Chem* 275: 20685-92, 2000.
98. **Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K, Schuler P and Morse P.** Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain: the effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium. *J Orthop Res* 20: 947-52, 2002.
99. **Wadhwa S, Godwin SL, Peterson DR, Epstein MA, Raisz LG and Pilbeam CC.** Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res* 17: 266-74, 2002.
100. **Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD and Franceschi RT.** Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 17: 101-10, 2002.
101. **Lai CF and Cheng SL.** Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 15514-22, 2002.
102. **Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Sanders JL and Brown EM.** Activation of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases by extracellular calcium-sensing receptor agonists induces mitogenic responses in the mouse osteoblastic MC3T3-E1 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 363-368, 2000.
103. **Farley JR and Baylink DJ.** Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism* 35: 563-71, 1986.
104. **Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K, Yoshikawa H and Itoh K.** Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res* 17: 1785-94, 2002.

105. **Kenny JS, Kisaalita WS, Rowland G, Thai C and Foutz T.** Quantitative study of calcium uptake by tumorigenic bone (TE-85) and neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells exposed to extremely-low-frequency (ELF) electric fields. *FEBS Lett* 414: 343-348, 1997.
106. **Wang Q, Zhong S, Ouyang J, Jiang L, Zhang Z, Xie Y and Luo S.** Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clin Orthop* 348: 259-268, 1998.
107. **Ozawa H, Fukuhara T, Abe E, Suda T and Shibasaki Y.** Electric-Fields Stimulate DNA-Synthesis of Mouse Osteoblast-Like Cells (Mc3T3-E1) by a Mechanism Involving Calcium-Ions. *J Cell Physiol* 138: 477-483, 1989.
108. **Cai GP, Liu JM, Chen G and Zhao NM.** Ca<sup>2+</sup> flux as a response of peritoneal exudative macrophages to weak alternating electric fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 40: 15-19, 1996.
109. **Fitzsimmons RJ, Farley JR, Adey WR and Baylink DJ.** Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposure to a low-amplitude, low-frequency electric field: Evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. *J Cell Physiol* 139: 586-591, 1989.
110. **Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR, Kanczler JM, Simon B, Abbott J, Blake DR and Stevens CR.** Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 458-461, 1998.
111. **Sollazzo V, Traina GC, DeMattei M, Pellati A, Pezzetti F and Caruso A.** Responses of human MG-63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18: 541-547, 1997.
112. **Fitzsimmons RJ, Ryaby JT, Magee FP and Baylink DJ.** IGF-II receptor number is increased in TE-85 osteosarcoma cells by combined magnetic fields. *J Bone Miner Res* 10: 812-819, 1995.
113. **Zhuang HM, Wang W, Seldes RM, Tahernia AD, Fan HJ and Brighton CT.** Electrical-Stimulation Induces the Level of TGF-Beta-1 Messenger-RNA in Osteoblastic Cells by a Mechanism Involving Calcium/Calmodulin Pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 225-229, 1997.
114. **Fitzsimmons RJ, Honda Y, Baylink DJ and Mohan S.** IGF-II Is Required for the Action of Elevated Extracellular Calcium to Increase Cell-Proliferation in Normal Human Bone-Cells. *J Bone Miner Res* 10: S309-S309, 1995.
115. **Fitzsimmons RJ, Strong DD, Mohan S and Baylink DJ.** Low-amplitude, low-frequency electric field-stimulated bone cell proliferation may in part be mediated by increased IGF-II release. *J Cell Physiol* 150: 84-89, 1992.
116. **Fitzsimmons RJ, Ryaby JT, Magee FP and Baylink DJ.** Combined Magnetic-Fields Increased Net Calcium Flux in Bone-Cells. *Calcif Tissue Int* 55: 376-380, 1994.
117. **Bourguignon GJ and Bourguignon LYW.** Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in Ca<sup>2+</sup> influx and the exposure of additional insulin receptors. *J Cell Physiol* 140: 379-385, 1989.
118. **Goodman R, Blank M, Lin H, Dai R, Khorkova O, Soo L, Weisbrot D and Henderson A.** Increased levels of HSP70 transcripts induced when cells are exposed to low frequency electromagnetic fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 33: 1994.
119. **Reinbold KA and Pollack SR.** Serum plays a critical role in modulating [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of primary culture bone cells exposed to weak ion-resonance magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18: 203-214, 1997.
120. **Norton LA and Rovetti LA.** Calcium incorporation in cultured chondroblasts perturbed by an electromagnetic field. *J Orthop Res* 6: 559-566, 1988.
121. **Wang Q, Zhong SZ, Zhang W and Wang GY.** DNA synthesis and Ca<sup>2+</sup> metabolism of isolated rat osteoblast-like cells under direct current stimulation. *Electro and Magnetobiology* 16: 87-93, 1997.
122. **Korenstein R, Somjen D, Fischler H and Binderman I.** Capacitive pulsed electric stimulation of bone cells induction of cyclic-AMP change and DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* 803: 302-307, 1984.
123. **Luben RA, Cain CD, Chen MCY, Rosen DM and Adey WR.** Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: Inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4180-4184, 1982.
124. **Fitzsimmons RJ and Baylink DJ.** Growth factors and electromagnetic fields in bone. *Bone Repair and Regeneration* 21: 401-406, 1994.
125. **Guerkov HH, Lohmann CH, Liu Y, Dean DD, Simon BJ, Heckman JD, Schwartz Z and Boyan BD.** Pulsed electromagnetic fields increase growth factor release by nonunion cells. *Clin Orthop* 265-79, 2001.
126. **Bourguignon GJ and Bourguignon LYW.** Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. *FASEB J* 1: 398-402, 1987.



127. **Goodman R, Bumann J, Wei L-X and Henderson AS.** Exposure of Human Cells to Electromagnetic Fields - Effect of Time and Field Strength on Transcript Levels. *Electro and Magnetobiology* 11: 19-28, 1992.
128. **Hirata M, Kusuzaki K, Takeshita H, Hashiguchi S, Hirasawa Y and Ashihara T.** Drug resistance modification using pulsing electromagnetic field stimulation for multidrug resistant mouse osteosarcoma cell line. *Anticancer Res* 21: 317-20, 2001.
129. **Nagai M and Ota M.** Pulsating electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and -4. *J Dent Res* 73: 1601-1604, 1994.
130. **Norton LA.** Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin Orthop* 167: 280-290, 1982.
131. **Walter RJ, Shtil AA, Roninson IB and Holian O.** 60-Hz electric fields inhibit protein kinase C activity and multidrug resistance gene (MDR1) up-regulation. *Radiat Res* 147: 369-375, 1997.
132. **DeMattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T and Sollazzo V.** Correlation Between Pulsed Electromagnetic-Fields Exposure Time and Cell-Proliferation Increase in Human Osteosarcoma Cell-Lines and Human Normal Osteoblast Cells in-Vitro. *Bioelectromagnetics* 20: 177-182, 1999.
133. **Fitzsimmons RJ, Adey WR, Baylink DJ and Farley J.** Embryonic Bone-Matrix Formation Is Increased After Exposure to a Low-Amplitude Capacitively Coupled Electric-Field, In vitro. *Biochim Biophys Acta* 882: 51-56, 1986.
134. **Hartig M, Joos U and Wiesmann HP.** Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *Eur Biophys J* 29: 499-506, 2000.
135. **Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B and Boyan BD.** Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res* 18: 637-646, 2000.
136. **Long Y, Cai GP, Guan ZC, Liu H and Liang XD.** Effects of electromagnetic fields on the bioactivities of an osteoblast-like cell line (UMR-106). *Electro and Magnetobiology* 19: 237-253, 2000.
137. **Lorich DG, Brighton CT, Gupta R, Corsetti JR, Levine SE, Gelb ID, Seldes R and Pollack SR.** Biochemical Pathway Mediating the Response of Bone-Cells to Capacitive Coupling. *Clin Orthop* 246-256, 1998.
138. **Pezzetti F, De Mattei M, Caruso A, Cadossi R, Zucchini P, Carinci F, Traina GC and Sollazzo V.** Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in vitro study. *Calcif Tissue Int* 65: 396-401, 1999.
139. **Wiesmann H, Hartig M, Stratmann U, Meyer U and Joos U.** Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1538: 28-37, 2001.
140. **VanderMolen MA, Donahue HJ, Rubin CT and McLeod KJ.** Osteoblastic networks with deficient coupling: Differential effects of magnetic and electric field exposure. *Bone* 27: 227-231, 2000.
141. **Aaron RK and Ciombor DM.** Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *J Orthop Res* 14: 582-589, 1996.
142. **Heermeier K, Spanner M, Trager J, Gradinger R, Strauss PG, Kraus W and Schmidt J.** Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of human osteoblastic cells. *Bioelectromagnetics* 19: 222-231, 1998.
143. **Liu HX, Lees P, Abbott J and Bee JA.** Pulsed electromagnetic fields preserve proteoglycan composition of extracellular matrix in embryonic chick sternal cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects* 1336: 303-314, 1997.
144. **McLeod KJ and Collazo L.** Suppression of a differentiation response in MC-3T3-E1 osteoblast-like cells by sustained, low-level, 30 Hz magnetic-field exposure. *Radiat Res* 153: 706-14, 2000.
145. **Rodemann HP.** Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and postmitotic differentiation states. *Differentiation* 42: 37-43, 1989.
146. **Yonemori K, Matsunaga S, Ishidou Y, Maeda S and Yoshida H.** Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. *Bone* 19: 173-180, 1996.
147. **Pilla AA, Nasser PR and Kaufman JJ.** Gap Junction Impedance, Tissue Dielectrics and Thermal Noise Limits for Electromagnetic-Field Bioeffects. *Bioelectrochem Bioenerg* 35: 63-69, 1994.
148. **Li CM, Chiang H, Fu YD, Lu DQ and Shao BJ.** Exposure to 50-Hz Electromagnetic-Fields - Effects of Time and Field-Strength on Gap Junctional Intercellular Communications. *Electro and Magnetobiology* 18: 249-256, 1999.
149. **Ubeda A, Trillo MA, House DE and Blackman CF.** A 50 Hz magnetic-field blocks melatonin-induced enhancement of junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 16: 2945-2949, 1995.

150. **Schimmelpfeng J, Stein JC and Dertinger H.** Action of 50 Hz magnetic-fields on cyclic-AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian-cells. *Bioelectromagnetics* 16: 381-386, 1995.
151. **Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Li Z, Simon BJ, Sylvia VL, Dean DD, Bonewald LF, Donahue HJ and Boyan BD.** Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 21: 326-34, 2003.
152. **Yamaguchi DT, Huang J, Ma D and Wang PK.** Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation. *J Cell Physiol* 190: 180-188, 2002.
153. **Robblee LS and Rose TL.** Electrochemical guidelines for selection of protocols and electrode materials for neural stimulation. In: *Neural prostheses: Fundamental studies*, edited by Agnew WF and McCreery DB. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1990, p. 25-66.
154. **de Haro C, Mas R, Abadal G, Munoz J, Perez-Murano F and Dominguez C.** Electrochemical platinum coatings for improving performance of implantable microelectrode arrays. *Biomaterials* 23: 4515-21, 2002.
155. **Blau A, Ziegler C, Heyer M, Endres F, Schwitzgebel G, Matthies T, Stieglitz T, Meyer JU and Gopel W.** Characterization and optimization of microelectrode arrays for in vivo nerve signal recording and stimulation. *Biosens Bioelectron* 12: 883-92, 1997.
156. **Kortüm G.** *Lehrbuch der Elektrochemie*. Weinheim: Verlag Chemie, 1957.
157. **Bott AW.** Electrochemical Techniques for the Characterization of Redox Polymers. *Current Separations* 19: 71-75, 2001.
158. **Macdonald JR.** *Impedance Spectroscopy - Emphasizing Solid Materials and Systems*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc., 1987.
159. **de Boer RW and van Oosterom A.** Electrical properties of platinum electrodes: impedance measurements and time-domain analysis. *Med Biol Eng Comput* 16: 1-10, 1978.
160. **Macdonald DD, Sikora E and Engelhardt G.** Characterizing Electrochemical Systems in the Frequency Domain. *Electrochimica Acta* 43: 87-107, 1998.
161. **Berendson J and Simonsson D.** Electrochemical aspects of treatment of tissue with direct current. *Eur J Surg Suppl* 111-5, 1994.
162. **McCreery DB and Agnew WF.** Mechanisms of stimulation-induced neural damage and their relation to guidelines for safe stimulation. In: *Neural prostheses: Fundamental studies*, edited by Agnew WF and McCreery DB. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1990, p. 297-317.
163. **Fung SH, Burstein D and Born RT.** In vivo microelectrode track reconstruction using magnetic resonance imaging. *J Neurosci Methods* 80: 215-24, 1998.
164. **Henderson JM, Pell M, O'Sullivan DJ, McCusker EA, Fung VS, Hedges P and Halliday GM.** Postmortem analysis of bilateral subthalamic electrode implants in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17: 133-7, 2002.
165. **Norlin A, Pan J and Leygraf C.** Investigation of Interfacial Capacitance of Pt, Ti and Tin Coated Electrodes by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Biomolecular Engineering* 19: 67-71, 2002.
166. **Pilla AA, Nasser PR and Kaufman JJ.** On the Sensitivity of Cells and Tissues to Therapeutic and Environmental Electromagnetic-Fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 30: 161-169, 1993.
167. **Weaver JC, Astumian and R.D.** The Response of Living Cells to Very Weak Electric Fields: The Thermal Noise Limit. *Science* 247: 459-462, 1990.
168. **Weaver JC and Astumian RD.** Estimates for ELF Effects: Noise-Based Thresholds and the Number of Experimental Conditions Required for Empirical Searches. *Bioelectromagnetics Supplement* 1: 119-138, 1992.
169. **McLeod KJ, Lee RC and Ehrlich HP.** Frequency dependence of electric field modulation of fibroblast protein synthesis. *Science* 236: 1465-1469, 1987.
170. **Krude T.** Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* 247: 148-59, 1999.
171. **Wang G, Miskimins R and Miskimins WK.** Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1). *Exp Cell Res* 254: 64-71, 2000.
172. **Uzbekov R, Chartrain I, Philippe M and Arlot-Bonnemains Y.** Cell cycle analysis and synchronization of the Xenopus cell line XL2. *Exp Cell Res* 242: 60-8, 1998.
173. **Uzbekov R, Prigent C and Arlot-Bonnemains Y.** Cell cycle analysis and synchronization of the Xenopus laevis XL2 cell line: study of the kinesin related protein XIEg5. *Microsc Res Tech* 45: 31-42, 1999.
174. **Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J and Niemann H.** Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* 62: 412-9, 2000.

175. **O'Connor PM, Ferris DK, Pagano M, Draetta G, Pines J, Hunter T, Longo DL and Kohn KW.** G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently. *J Biol Chem* 268: 8298-308, 1993.
176. **Tobey RA, Oishi N and Crissman HA.** Cell cycle synchronization: reversible induction of G2 synchrony in cultured rodent and human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5104-8, 1990.
177. **Crissman HA and Steinkamp JA.** Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol* 59: 766-71, 1973.
178. **Krishan A.** Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66: 188-93, 1975.
179. **Watson JV, Chambers SH and Smith PJ.** A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8: 1-8, 1987.
180. **Ormerod MG, Payne AW and Watson JV.** Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry* 8: 637-41, 1987.
181. **Goldberg GS, Bechberger JF and Naus CC.** A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. *BioTechniques* 18: 490-7, 1995.
182. **Ziambaras K, Lecanda F, Steinberg TH and Civitelli R.** Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13: 218-228, 1998.
183. **Ihrig I, Schubert F, Habel B, Haberland L and Glaser R.** The UVA light used during the fluorescence microscopy assay affects the level of intracellular calcium being measured in experiments with electric-field exposure. *Radiat Res* 152: 303-311, 1999.
184. **Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM and Currie MG.** A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 214: 11-16, 1993.
185. **Nauman EA, Satcher RL, Keaveny TM, Halloran BP and Bikle DD.** Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with shortterm increases in PGE(2) but no change in mineralization. *J Appl Physiol* 90: 1849-1854, 2001.
186. **Blackman CF, Elder JA, Weil SG, Benane SG, Eichinger DC and House DE.** Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation: Effect of modulation frequency and field strength. *Bioelectromagnetics* 14: 93-98, 1979.
187. **Yoo JS and Park SM.** An Electrochemical Impedance Measurement Technique Employing Fourier Transform. *Anal Chem* 72: 2035-2041, 2000.
188. **Lang G and Heusler KE.** Remarks on the Energetics of Interfaces Exhibiting Constant Phase Element Behaviour. *J Electroanal Chem* 457: 257-260, 1998.
189. **Zoltowski P.** On the Electrical Capacitance of Interfaces Exhibiting Constant Phase Element Behaviour. *J Electroanal Chem* 443: 149-154, 1998.
190. **Hitz C and Lasia A.** Experimental Study and Modeling of Impedance of the Her on Porous Ni Electrodes. *J Electroanal Chem* 500: 213-222, 2001.
191. **Gielen FL and Bergveld P.** Comparison of electrode impedances of Pt, PtIr (10% Ir) and Ir-AIROF electrodes used in electrophysiological experiments. *Med Biol Eng Comput* 20: 77-83, 1982.
192. **McIntyre CC and Grill WM.** Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes. *Ann Biomed Eng* 29: 227-235, 2001.
193. **McIntyre CC and Grill WM.** Selective microstimulation of central nervous system neurons. *Ann Biomed Eng* 28: 219-233, 2000.
194. **Contu F, Elsener B and Bohni H.** Characterization of Implant Materials in Fetal Bovine Serum and Sodium Sulfate by Electrochemical Impedance Spectroscopy. I. Mechanically Polished Samples. *J Biomed Mater Res* 62: 412-421, 2002.
195. **Bassett CA and Schink-Ascani M.** Long-term pulsed electromagnetic field (PEMF) results in congenital pseudarthrosis. *Calcif Tissue Int* 49: 216-20, 1991.
196. **Bassett C, Mitchell S and Gaston S.** Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg* 63: 511-523, 1981.
197. **Rubin J, McLeod KJ, Titus L, Nanes MS, Catherwood BD and Rubin CT.** Formation of osteoclast-like cells is suppressed by low-frequency, low-intensity electric-fields. *J Orthop Res* 14: 7-15, 1996.
198. **McLeod K, Donahue H, Levin P, Fontaine MA and Rubin CT.** Electric fields modulate bone cell function in a density-dependent manner. *J Bone Miner Res* 8: 977-984, 1993.
199. **Sollazzo V, Massari L, Caruso A, Demattei C and Pezzetti F.** Effects of Low-Frequency Pulsed Electromagnetic-Fields on Human Osteoblast-Like Cells in-Vitro. *Electro and Magnetobiology* 15: 75-83, 1996.
200. **Ikeda T, Futaesaku Y and Tsuchida N.** In vitro differentiation of the human osteosarcoma cell lines, HOS and KHOS. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62: 199-206, 1992.
201. **Clover J and Gowen M.** Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic Phenotype? *Bone* 15: 585-591, 1994.

202. **Cho MR, Thatte HS, Silvia MT and Golan DE.** Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *FASEB J* 13: 677-83, 1999.
203. **Ihrig I, Heese C and Glaser R.** Alterations of intracellular calcium concentration in mice neuroblastoma cells by electrical field and UVA. *Bioelectromagnetics* 18: 595-597, 1997.
204. **Xia SL and Ferrier J.** Propagation of a Calcium Pulse Between Osteoblastic Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1212-1219, 1992.
205. **Duncan R and Misler S.** Voltage-Activated and Stretch-Activated Ba-2+ Conducting Channels in an Osteoblast-Like Cell-Line (Umr-106). *FEBS Lett* 251: 17-21, 1989.
206. **Meszaros JG, Karin NJ and FarachCarson MC.** Voltage-sensitive calcium channels in osteoblasts: Mediators of plasma membrane signalling events. *Connect Tissue Res* 34-5: 161-165, 1996.
207. **Lundgren T and Linde A.** Voltage-Gated Calcium Channels and Nonvoltage-Gated Calcium-Uptake Pathways in the Rat Incisor Odontoblast Plasma-Membrane. *Calcif Tissue Int* 60: 79-85, 1997.
208. **Gu Y, Preston MR, Magnay J, ElHaj AJ and Publicover SJ.** Hormonally-regulated expression of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in osteocytic (MLO-Y4) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 536-542, 2001.
209. **Cho MR, Marler JP, Thatte HS and Golan DE.** Control of calcium entry in human fibroblasts by frequency-dependent electrical stimulation. *Front Biosci* 7: 1-8, 2002.
210. **Blank M.** Biological effects of electromagnetic fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 32: 1993.
211. **Tsong TY.** Active cation pumping of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, ATPase induced by an electric field. In: *Membranes, PTQ : ATP driven pumps and related transport*, edited by Fleischer S and Fleischer B. San Diego: Academic Press Inc., 1988, p. 240-250.
212. **Goren R, Lubart R, Reuveni H and Grossman N.** Calcium Influx and UVA-Enhanced Proliferation of Normal Human Keratinocyte Cultures. *J Invest Dermatol* 106: 367, 1996.
213. **Sakai H, Ito E, Cai RX, Yoshioka T, Kubota Y, Hashimoto K and Fujishima A.** Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO<sub>2</sub> ultrafine particles. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 1201: 259-265, 1994.
214. **Kikuyama A, Fukuda K, Mori S, Okada M, Yamaguchi H and Hamanishi C.** Hydrogen peroxide induces apoptosis of osteocytes: involvement of calcium ion and caspase activity. *Calcif Tissue Int* 71: 243-8, 2002.
215. **Orren DK, Petersen LN and Bohr VA.** A UV-responsive G2 checkpoint in rodent cells. *Mol Cell Biol* 15: 3722-30, 1995.
216. **Cooke MS, Finnegan MT, Herbert KE and Lunec J.** Cell-cycle and dose-dependence of DNA-damage and p53 expression following UVA irradiation. *Biochem Soc Trans* 23: S481-S481, 1995.
217. **Orren DK, Petersen LN and Bohr VA.** Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Mol Biol Cell* 8: 1129-42, 1997.
218. **De Laat A, van Tilburg M, van der Leun JC, van Vloten WA and de Gruijl FR.** Cell-cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol* 63: 492-497, 1996.
219. **Yamamoto N, Hayashihara K and Takagi Y.** Changes in UV sensitivity with cell cycle, clonal age, and cultural age in *Paramecium tetraurelia*. *Zoolog Sci* 14: 747-752, 1997.
220. **Petersen LN, Orren DK and Bohr VA.** Gene-specific and strand-specific DNA repair in the G1 and G2 phases of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 15: 3731-7, 1995.
221. **Naderi J, Hung M and Pandey S.** Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress. *Apoptosis* 8: 91-100, 2003.
222. **Allen FD, Hung CT, Pollack SR and Brighton CT.** Serum modulates the intracellular calcium response of primary cultured bone cells to shear flow. *J Biomech* 33: 1585-1591, 2000.
223. **Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H and Klotz LO.** Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 37: 391-7, 2003.
224. **Babich M, Foti LRP and Mathias KL.** Protein-Kinase-C Modulator Effects on Parathyroid Hormone-Induced Intracellular Calcium and Morphologic Changes in Umr 106-H5 Osteoblastic Cells. *J Cell Biochem* 65: 276-285, 1997.
225. **Hung CT, Allen FD, Pollack SR and Brighton CT.** Intracellular Ca<sup>2+</sup> Stores and Extracellular Ca<sup>2+</sup> Are Required in the Real-Time Ca<sup>2+</sup> Response of Bone-Cells Experiencing Fluid-Flow. *J Biomech* 29: 1411-1417, 1996.
226. **Guo L and Davidson RM.** Extracellular Ca<sup>2+</sup> increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in freshly isolated rat odontoblasts. *J Bone Miner Res* 14: 1357-1366, 1999.

227. **Muramatsu T, Yamashina Y, Tada H, Kobayashi N, Yamaji M, Ohno H, Shirai T, Takahashi A and Ohnishi T.** 8-Methoxypsoralen Plus UVA Induces the 72 kDa Heat-Shock Protein in Organ-Cultured Normal Human Skin. *Photochem Photobiol* 58: 809-812, 1993.
228. **Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M and Schwarz T.** Heat-shock protein-70 overexpression affects the response to ultraviolet-light in murine fibroblasts - Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 95: 926-933, 1995.
229. **Matsui MS, Wang NC, Macfarlane D and Deleo VA.** Long-Wave Ultraviolet-Radiation Induces Protein-Kinase-C in Normal Human Keratinocytes. *Photochem Photobiol* 59: 53-57, 1994.
230. **Mathieu N, Lebreton C, Tirache I, Morliere P and Coulomb B.** UVA-induced photooxidative stress in fibroblasts cultured in a collagen matrix. *J Invest Dermatol* 104: 157, 1995.
231. **Condaminet B, Redziniak G, Monsigny M and Kieda C.** Ultraviolet rays induced expression of lectins on the surface of a squamous carcinoma keratinocyte cell line. *Exp Cell Res* 232: 216-224, 1997.
232. **Ibbotson SH, Lambert CR, Moran MN, Lynch MC and Kochevar IE.** Benzoyl peroxide increases UVA-induced plasma membrane damage and lipid oxidation in murine leukemia L1210 cells. *J Invest Dermatol* 110: 79-83, 1998.
233. **Malorni W, Donelli G, Straface E, Santini MT, Paradisi S and Giacomoni PU.** Both UVA and UVB Induce Cytoskeleton-Dependent Surface Blebbing in Epidermoid Cells. *J Photochem Photobiol B* 26: 265-270, 1994.
234. **Markkanen A, Juutilainen J, Lang S, Pelkonen J, Rytomaa T and Naarala J.** Effects of 50 Hz magnetic field on cell cycle kinetics and the colony forming ability of budding yeast exposed to ultraviolet radiation. *Bioelectromagnetics* 22: 345-350, 2001.
235. **Bissonnette N and Hunting DJ.** p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 16: 3461-9, 1998.
236. **Vanderkooi JM.** The protein state of matter. *Biochim Biophys Acta* 1386: 241-253, 1998.
237. **DiCarlo AL, White NC and Litovitz TA.** Mechanical and electromagnetic induction of protection against oxidative stress. *Bioelectrochemistry* 53: 87-95, 2001.
238. **Cantoni O, Sestili P, Fiorani M and Dacha M.** Effect of 50 Hz sinusoidal electric and/or magnetic fields on the rate of repair of DNA single strand breaks in cultured mammalian cells exposed to three different carcinogens: Methylmethane sulphonate, chromate and 254 nm UV radiation. *Biochem Mol Biol Int* 38: 527-533, 1996.
239. **Kumlin T, Alhonen L, Janne J, Lang S, Kosma VM and Juutilainen J.** Epidermal ornithine decarboxylase and polyamines in mice exposed to 50 Hz magnetic fields and UV radiation. *Bioelectromagnetics* 19: 388-391, 1998.
240. **Pakhomova ON, Belt ML, Mathur SP, Lee JC and Akyel Y.** Ultra-wide band electromagnetic radiation does not affect UV-induced recombination and mutagenesis in yeast. *Bioelectromagnetics* 19: 128-130, 1998.
241. **Ueno M, Fukuda K, Oh M, Asada S, Nishizaka F, Hara F and Tanaka S.** Protein kinase C modulates the synthesis of nitric oxide by osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 63: 22-26, 1998.
242. **Sauer H, Rahimi G, Hescheler J and Wartenberg M.** Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 75: 710-23, 1999.
243. **Sontag W.** Action of extremely low frequency electric fields on the cytosolic calcium concentration of differentiated HL-60 cells: nonactivated cells. *Bioelectromagnetics* 19: 32-40, 1998.
244. **Jacobson-Kram D, Tepper J, Kuo P, San RH, Curry PT, Wagner VO and Putman DL.** Evaluation of potential genotoxicity of pulsed electric and electromagnetic fields used for bone growth stimulation. *Mutat Res* 388: 45-57, 1997.
245. **Davidovitch Z, Shanfeld J, Montgomery P, Lally E, Laster L, Furst L and Korostoff E.** Biochemical mediators of the effects of mechanical forces in electric currents on mineralized tissue. *Calcif Tissue Int* 36: s79-s86, 1984.
246. **Brighton C and Townsend PF.** Increased cAMP production after short term capacitively coupled stimulation in bovine growth plate chondriocytes. *J Orthop Res* 6: 552-558, 1988.
247. **Thumm S, Loschinger M, Glock S, Hammerle H and Rodemann HP.** Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields. *Radiat Environ Biophys* 38: 195-9, 1999.
248. **Sontag WHD.** Response of cytosolic calcium, cyclic AMP, and cyclic GMP in dimethylsulfoxide-differentiated HL-60 cells to modulated low frequency electric currents. *Bioelectrochem Bioenerg* 19: 452-458, 1998.
249. **Chiono M, Mahey R, Tate G and Cooper DMF.** Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry Exclusively Inhibits cAMP Synthesis in C6-2B Glioma-Cells - Evidence That Physiologically Evoked Ca<sup>2+</sup> Entry Regulates Ca<sup>2+</sup>-Inhibitable Adenylyl-Cyclase in Nonexcitable Cells. *J Biol Chem* 270: 1149-1155, 1995.

250. **Falcone S, Mauro L, de Rose G, Paolucci C, Sciorati C, Ando S and Clementi E.** Nitric oxide regulates oestrogen-activated signalling pathways at multiple levels through cyclic GMP-dependent recruitment of insulin receptor substrate 1. *Biochem J* 366: 165-73, 2002.
251. **Katz RW, Teng SY, Thomas S and Landesberg R.** Paracrine activation of extracellular signal-regulated kinase in a simple in vitro model of wounded osteoblasts. *Bone* 31: 288-95, 2002.
252. **Hatton JP, Pooran M, Li CF, Luzzio C and Hughes-Fulfor M.** A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway. *J Bone Miner Res* 18: 58-66, 2003.
253. **Volmat V, Camps M, Arkinstall S, Pouyssegur J and Lenormand P.** The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci* 114: 3433-43, 2001.
254. **Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T and Chihara K.** Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 36024-31, 2002.
255. **Kozawa O, Hatakeyama D and Uematsu T.** Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem* 84: 583-9, 2002.
256. **Sömjen D, Korenstein R, Fischler H and Binderman I.** Effects of electric field intensity on the response of cultured bone cells to parathyroid hormone and prostaglandine-E2. *Excerpta Medica* 412-416, 1982.
257. **Sömjen D, Yariv M, Kaye AM, Korenstein R, Fischler H and Binderman I.** Ornithine decarboxylase activity in cultured bone cells is activated by bone-seeking hormones and physical stimulation. *Advances in polyamine research* 4: 713-718, 1983.
258. **Korenstein R, Somjen D, Laub F, Danon A, Fischler H and Bindermann I.** Pulsed external electric fields are mitogens for bone cells. *Biological Structures and Coupled Flows* 401-410, 1983.
259. **Hillsley MV and Frangos JA.** Alkaline-Phosphatase in Osteoblasts Is Down-Regulated by Pulsatile Fluid-Flow. *Calcif Tissue Int* 60: 48-53, 1997.
260. **Tang Q, Chen G and Zhao NM.** Effects of ELF electric field on proliferation of mouse osteoblastic cells. *Bioelectrochem Bioenerg* 47: 349-353, 1998.
261. **Sauer H, Stanelle R, Hescheler J and Wartenberg M.** The DC electrical-field-induced Ca(2+) response and growth stimulation of multicellular tumor spheroids are mediated by ATP release and purinergic receptor stimulation. *J Cell Sci* 115: 3265-73, 2002.
262. **Sylvia VL, Schwartz Z, Del Toro F, DeVeau P, Whetstone R, Hardin RR, Dean DD and Boyan BD.** Regulation of phospholipase D (PLD) in growth plate chondrocytes by 24R,25-(OH)2D3 is dependent on cell maturation state (resting zone cells) and is specific to the PLD2 isoform. *Biochim Biophys Acta* 1499: 209-221, 2001.
263. **Wiltink A and Bos MP.** S-Phase Independence of Parathyroid Hormone-Induced Calcium Signaling in Primary Osteoblast-Like Cells. *Cell Calcium* 17: 270-278, 1995.
264. **Segaert S, Degreef H and Bouillon R.** Vitamin D receptor expression is linked to cell cycle control in normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 89-94, 2000.
265. **Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH and Lundgren E.** Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *J Cell Physiol* 156: 395-8, 1993.
266. **Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E and Mild KH.** Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16: 41-47, 1995.
267. **Lohmann CH, Bonewald LF, Sisk MA, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD and Schwartz Z.** Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *J Bone Miner Res* 15: 1169-1180, 2000.
268. **Diniz P, Shomura K, Soejima K and Ito G.** Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 23: 398-405, 2002.
269. **Loschinger M, Thumm S, Hammerle H and Rodemann HP.** Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields. *Toxicol Lett* 96-7: 369-376, 1998.
270. **Lin H, Blank M, RossolHASeroth K and Goodman R.** Regulating genes with electromagnetic response elements. *J Cell Biochem* 81: 143-148, 2001.
271. **Tjandrawinata RR, Vincent VL and Hughesfulford M.** Vibrational Force Alters Messenger-RNA Expression in Osteoblasts. *FASEB J* 11: 493-497, 1997.
272. **McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA and Cortizo AM.** Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol* 2: 16, 2001.

273. **Haberland L.** *Hypothesen zu zellulären, nichtthermischen Wirkungsmechanismen elektromagnetischer Felder.* Berlin: Verlag für Wissenschaft und Forschung, 1999.
274. **Danciu TE, Adam RM, Naruse K, Freeman MR and Hauschka PV.** Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett* 536: 193-7, 2003.
275. **Johnson DL, Mcallister TN and Frangos JA.** Fluid-Flow Stimulates Rapid and Continuous Release of Nitric-Oxide in Osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 34: E205-E208, 1996.
276. **Smalt R, Mitchell FT, Howard RL and Chambers TJ.** Induction of No and Prostaglandin E-2 in Osteoblasts by Wall-Shear Stress But Not Mechanical Strain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 36: E751-E758, 1997.
277. **Hishikawa K, Oemar BS, Yang ZH and Luscher TF.** Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ Res* 81: 797-803, 1997.
278. **Ajubi NE, KleinNulend J, Alblas MJ, Burger EH and Nijweide PJ.** Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE(2) production by cultured osteocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 39: E171-E178, 1999.
279. **Bakker AD, Soejima K, KleinNulend J and Burger EH.** The production of nitric oxide and prostaglandin E-2 by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 34: 671-677, 2001.
280. **Pilla AA.** Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *J Orthop Sci* 7: 420-428, 2002.
281. **Edmonds DT.** Possible mechanisms for interaction between biological cells and low-frequency low amplitude electric and magnetic field. *Manuskript* 1993 1993.
282. **Pickard WF and Rosenbaum FJ.** Biological Effects of Microwaves at Membrane Level - 2 Possible Athermal Electrophysiological Mechanisms and a Proposed Experimental Test. *Math Biosci* 39: 235-253, 1978.
283. **Astumian RD, Weaver JC and Adair RK.** Rectification and signal averaging of weak electric fields by biological cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3740-3, 1995.
284. **Weaver JC, Vaughan TE, Adair RK and Astumian RD.** Theoretical limits on the threshold for the response of long cells to weak extremely low frequency electric fields due to ionic and molecular flux rectification. *Biophys J* 75: 2251-2254, 1998.
285. **Green J and Kleeman CR.** Role of Calcium and cAMP Messenger Systems in Intracellular pH Regulation of Osteoblastic Cells. *Am J Physiol* 262: C111-C121, 1992.

## Anhang

Tab. 6-1 Schema zu Feld- und Messparametern für Untersuchungen an Einzelzellen in Monolayerkultur.

Zellen	Wellenform	Frequenz [Hz]	Feldstärke [V/m]	Dauer [min]	Beginn [min]	Farbstoff	CO <sub>2</sub>	FKS	Oxidativer Stress	UV [kJ/m <sup>2</sup> ]
OB	Sinus	100	200	5	5	Fura	+	+	-	30/125
OB	Sinus AM	5000	200	5	5	Fura	+	+	-	30/125
HOS	Sinus	3000	200	5	5	Fura	+	+	-	30
HOS	Sinus AM	100 bis 100000	200	5	5	Fura	+	+	-	15/30
HOS	Sinus AM	100 bis 100000	200	5	5	CM	+	+	-	30
OB	Puls	1.5	10 bis 3000	10	5	Fura/CM	+	+	-	15
HOS	Puls	1.5	10 bis 3000	10	5	Fura/CM	+	+	-/+ SIN	15
HOS synchr.	Sinus AM	3000	200	10	5	Fura	+	+	-	15
HOS synchr.	Sinus	16	200	10	5	Fura	+	+	-	15
HOS synchr.	Puls	1.5	200	10	5	Fura	+	+	-	15

Tab. 6-2 Schema zu Feld- und Messparametern für Untersuchungen an Zellpopulationen von HOS TE85 in Monolayerkultur.

Wellenform	Frequenz [Hz]	Dauer [min]	Feldstärke [V/m]	cAMP	cGMP	PGE <sub>2</sub>	DNA	ALP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nitrit	MAPK
Unipolare Pulse	0.15	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	1.5	30	150	-	-	-	+	+	+	+	+
	4	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	8	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	15	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	45	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	75	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	150	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
Sinus	0.15	30	150	-	-	-	+	+	-	+	-
	1.5	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-



	8	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	15	30	150	-	-	-	+	+	+	+	+
	45	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	75	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	150	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	1000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	3000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	+
	5000	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	10000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	20000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	50000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	100000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
Sinus AM	3000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 6-3 Schema zu Feld- und Messparametern für Untersuchungen an Zellpopulationen von HOS TE85 in dreidimensionaler Kultur.

Wellenform	Frequenz [Hz]	Dauer [min]	Feldstärke [V/m]	cAMP	cGMP	PGE <sub>2</sub>	DNA	ALP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nitrit	MAPK
Unipolare Pulse	0.15	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	1.5	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	4	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	8	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	15	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	45	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	75	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	150	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	3000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
Sinus	0.15	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	1.5	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	8	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	15	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	45	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	75	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	150	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	3000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
Sinus AM	3000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-

Tab. 6-4 Schema zu Feld- und Messparametern für Untersuchungen an Zellpopulationen von primären OB in dreidimensionaler Kultur.

Wellenform	Frequenz [Hz]	Dauer [min]	Feldstärke [V/m]	cAMP	cGMP	PGE <sub>2</sub>	DNA	ALP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nitrit	MAPK
Sinus	1000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	3000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	5000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	10000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	20000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	50000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
	100000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-
Sinus AM	3000	30	150	-	-	-	+	+	-	-	-

Tab. 6-5 Schema zu Feld- und Messparametern für Untersuchungen an Zellpopulationen von primären OB in Monolayerkultur.

Wellenform	Frequenz [Hz]	Dauer [min]	Feldstärke [V/m]	cAMP	cGMP	PGE <sub>2</sub>	DNA	ALP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nitrit	MAPK
Sinus	1000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	3000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	+
	5000	30	150	-	-	-	+	+	+	+	-
	10000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	20000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	50000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
	100000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	-
Sinus AM	3000	30	150	+	+	+	+	+	+	+	+

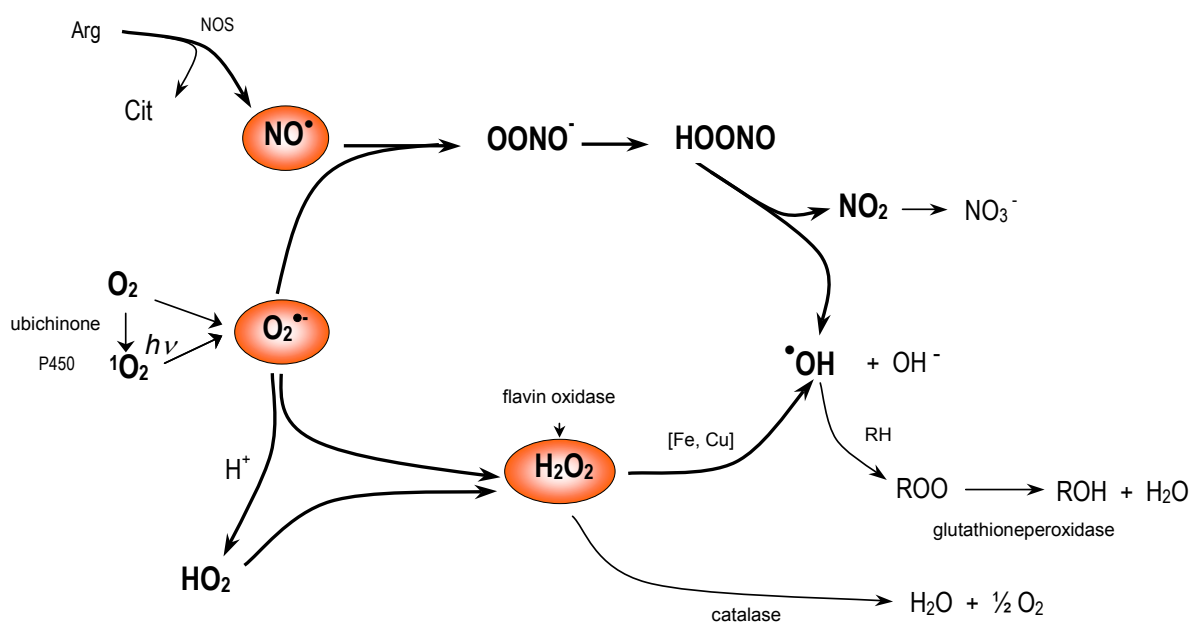


Abb. 6-2 Schema zur Entstehung und möglicher Reaktionswege von Radikalen im Zellstoffwechsel

## Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich danken. Besonderer Dank gilt Prof. em. R. Glaser für die freundliche Überlassung des Themas und die hilfreiche Begleitung bei der Anfertigung der Dissertation.

Ebenso danke ich Dr. U. Gimsa und Dr. J. Gimsa für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Elektrodenproblematik und die Möglichkeit, die Arbeit an der Universität Rostock zu beenden.

Für die Unterstützung in der Zellkultur und bei der Durchführung zahlreicher Experimente danke ich besonders Frau G. Reinke und Simone Löscher. Daneben möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen der Berliner und der Rostocker Arbeitsgruppen bedanken. Vor allem Derk Wachner, Steffen Lippert, Lutz Haberland und Jutta Donath haben dazu beigetragen, dass Rostock immer eine Reise wert war.

Bedanken möchte ich mich für die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Walden von der Charité, bei der ich die FACS-Messungen durchführen durfte.

Des Weiteren gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Prof. v. Rienen von der Universität Rostock, insbesondere Dr. U. Schreiber, die mir die Möglichkeit gaben, die numerischen Modellierungen der Elektroden durchzuführen.

Ebenfalls danken möchte ich dem Elektronenmikroskopiezentrum der Universität Rostock für die REM-Aufnahmen.

Außerdem danke ich Dr. G. Pilarczyk vom IBMT, in dessen Labor ich die MAPK-Fluoreszenzmikroskopie durchführen konnte.

Besonderer Dank gilt Jeanette und Lutz für das Lesen der Arbeit und die vielen Hinweise und Hilfestellungen.

Abschließend danke ich meiner Familie für ihr jahrelanges Verständnis und ihre Unterstützung.

## Lebenslauf

1971	geboren in Gera
1978 - 1986	Polytechnische Oberschule in Hermsdorf
1986 - 1990	Abitur an der Erweiterten Oberschule in Jena (Spezialschule mathematisch- naturwissenschaftlich technischer Fachrichtung)
1990 - 1997	Biophysikstudium an der Humboldt- Universität zu Berlin <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Spezialisierung: Tierphysiologie, Strahlen- und Umweltbiophysik</li> <li>▪ Diplomarbeit: Untersuchungen zum Einfluss extrazellulärer Faktoren auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von Osteosarcomazellen</li> </ul>
06/1997 – 07/2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologie der Humboldt- Universität zu Berlin, AG Experimentelle Biophysik
09/2002 – 03/2003 07/2003 – 03/2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Neurologie der Universität Rostock, Nachwuchsgruppe „Neurodegenerative Erkrankungen“

Berlin, 30. Januar 2004

## Publikationen und Tagungsbeiträge

I. Ihrig, F. Schubert, B. Habel, L. Haberland, R. Glaser

The UVA light used during the fluorescence microscopy assay affects the level of intracellular calcium being measured in experiments with electric-field exposure.  
Radiat Res. 1999 Sep;152(3):303-11.

B. Habel, R. Glaser

Human osteoblast-like cells respond not only to the extracellular calcium concentration but also to its changing rate.

Eur Biophys J. 1998;27(4):411-6.

B. Habel, R. Glaser

Influence of pulsed electric fields on intracellular calcium of bone cells.

21. Annual Meeting of the Bioelectromagnetic Society, Long Beach, USA (1999), BEMS Abstract book P-33

R. Glaser, I. Ihrig, B. Habel, L. Haberland and F. Schubert

Response of neuroblastoma, jurkat and osteosarcoma cells on AC electric fields – measurements with fluorescence microscopic  $\text{Ca}^{2+}$  - and Redox-indicators.

21. Annual Meeting of the Bioelectromagnetic Society, Long Beach, USA (1999), BEMS Abstract book P-36

R. Glaser, B. Habel, L. Haberland, F. Schubert, G. Reinke

A new way of objective evaluation of field effects on single cells.

22. Annual Meeting of the Bioelectromagnetic Society, Munich, Germany (2000), BEMS Abstract book 7-7

B. Habel, G. Reinke, R. Glaser

Effects of pulsed and AC electric fields on intracellular calcium of bone cells.

22. Annual Meeting of the Bioelectromagnetic Society, Munich, Germany (2000), BEMS Abstract book P-95

B. Habel, J. Gimsa, U. Schreiber, U. van Rienen, U. Strauss, U. Gimsa

Charakterisierung von Elektroden zur tiefen Hirnstimulation in Tiermodellen.

76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Hamburg (2003), DGN Abstract book P812

U. Gimsa, B. Habel, U. Schreiber, U. van Rienen, J. Henning, U. Strauss, J. Gimsa

Characterization of Electrodes Used in Animal Models of Deep Brain Stimulation

33. Annual Meeting of the Society for Neurosciences, New Orleans, USA (2003)

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erarbeitet und verfasst zu haben.

Berlin, ...